

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉLABORATION DE BIOESSAIS BASÉS SUR LA FLUORESCENCE
CHLOROPHYLLIENNE DU PHYTOPLANKTON DANS L'ÉTUDE DE
PROBLÉMATIQUES ENVIRONNEMENTALES ÉMERGENTES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MARIE-CLAUDE PERRON

MAI 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Philippe Juneau, pour m'avoir donné l'occasion d'entreprendre ma maîtrise au sein de son laboratoire, de m'avoir si bien encadrée, conseillée et encouragée. J'ai fait partie pendant deux ans d'un laboratoire dynamique, entourée de collègues généreux que je tiens à remercier pour leur support, les nombreux conseils et pour le bon temps passé en leur compagnie. Alors merci à Fran Bristow, Annie Chalifour, Thibault Chesney, Charles Deblois, Vincent Ouellet-Jobin, Francis Racine, Akash Sastri et Gabrielle Vernouillet.

Je remercie également les membres de mon comité d'évaluation de ma proposition de recherche, Catherine Jumarie et Sami Haddad, pour leurs judicieux conseils et commentaires au tout début de mon projet de maîtrise ainsi que Catherine Jumarie et Philip Spears pour le temps alloué à la lecture et l'évaluation de ce mémoire.

Merci également à Bénédicte Aubry pour les dosages des microcystines au HPLC ainsi qu'à Nathalie Boucher et François Bellemare de Lab_Bell Inc. pour le prêt du LuminoTox et l'aide technique. Merci aussi au Dr Baosheng Qiu qui m'a accueilli dans son laboratoire de la Central China Normal University de Wuhan, en République Populaire de Chine.

Finalement, merci à Bernard, ma famille et mes amis, pour leur amour et leur soutien, essentiel à mon équilibre et à mon bonheur.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xii
PROBLÉMATIQUE	1
CHAPITRE I	
LES BIOESSAIS	4
1.1 Qu'est-ce qu'un bioessai?	4
1.2 Les bioessais basés sur la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i>	6
1.2.1 <i>La photosynthèse</i>	6
1.2.2 <i>La fluorescence chlorophyllienne</i>	9
1.2.3 <i>Le Plant Efficiency Analyzer (PEA)</i>	11
1.2.4 <i>Le LuminoTox</i>	14
CHAPITRE II	
LES CYANOBACTÉRIES ET LES MICROCYSTINES	16
2.1 Les cyanobactéries	16
2.2 Les floraisons de cyanobactéries	17
2.3 Les cyanotoxines	18
2.3.1 La microcystine (MC)	19
CHAPITRE III	
LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	22
3.1 Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien?	22
3.2 Le nonylphénol	24
3.3 L'octylphénol	26
3.4 L'estradiol	27

CHAPITRE IV

ARTICLE: USE OF CHLOROPHYLL *a* FLUORESCENCE TO DETECT THE EFFECT OF MICROCYSTIN ON PHOTOSYNTHESIS AND PHOTOSYSTEM II ENERGY FLUXES OF GREEN ALGAE

	30
4.1 Contribution à l'article	31
4.2 Abstract	31
4.3 Introduction	32
4.4 Material and methods	33
4.4.1 <i>Biological Materials</i>	33
4.4.2 <i>Microcystin preparation</i>	34
4.4.3 <i>Lipopolysaccharides (LPS) preparation: extraction and concentration measurement</i>	35
4.4.4 <i>Toxicity testing procedure</i>	35
4.4.5 <i>Measurement of fluorescence</i>	36
4.4.6 <i>Data analysis and statistics</i>	37
4.5 Results	37
4.5.1 <i>Exposition of Chlorella vulgaris to standards of microcystin</i>	37
4.5.2 <i>Exposition of Chlorella vulgaris to extracts of microcystins</i>	38
4.5.3 <i>Sensitivity of different green algae to microcystin extract</i>	39
4.5.4 <i>Lipolysaccharides (LPS)</i>	39
4.5.5 <i>Sensitivity of fluorometric methods</i>	40
4.6 Discussion	40
4.6.1 <i>Effect of standard of microcystin on Chlorella vulgaris photosynthesis</i>	40
4.6.2 <i>Effect of crude extracts of microcystin on photosynthesis</i>	42
4.6.3 <i>Difference of sensitivity between species</i>	42
4.6.4 <i>Toxicity of Lipopolysaccharides (LPS)</i>	44
4.7 Conclusion	45
4.8 Acknowledgments	46
4.9 References	47
4.10 Figure legend	58
4.11 Figures	59

4.12 Table	65
CHAPITRE V	
ARTICLE: EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTERS ON PHOTOSYSTEM II ENERGY FLUXES OF GREEN ALGAE AND CYANOBACTERIA	66
5.1 Contribution à l'article	67
5.2 Abstract	67
5.3 Introduction	68
5.4 Material and methods	70
5.4.1 <i>Cell culture and sample preparation</i>	70
5.4.2 <i>Preparation of endocrine disrupters and exposition</i>	70
5.4.3 <i>Measurement of fluorescence transient</i>	71
5.4.4 <i>Data analysis and statistics</i>	71
5.5 Results and discussion	72
5.5.1 <i>Effect of 4-nonylphenol (4-NP) on photosystem II energy fluxes</i>	72
5.5.2 <i>Effect of 4-octylphenol (4-OP) on photosystem II energy fluxes</i>	74
5.5.3 <i>Effect of β-Estradiol (β-E) on photosystem II energy fluxes</i>	75
5.5.4 <i>Species sensitivity to endocrine disrupters</i>	76
5.6 Conclusion	78
5.7 Acknowledgments	78
5.8 References	79
5.9 Figure legend	85
5.10 Figures	86
5.11 Table	92
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	93
RÉFÉRENCES	95

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schéma illustrant la structure de l'appareil photosynthétique et du transport des électrons. (Tirée de Taiz et Zeiger, 2006).	7
1.2	Antenne associée au centre réactionnel de la chaîne de transport des électrons. (Tirée de Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)	8
1.3	Voies de dissipation d'énergie de l'état singulet excité de la chlorophylle (¹ Chl*) du PSII. (Modifié de Müller et al., 2001).	10
1.4	Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne présentant les transitions O-J-I-P, exprimée sur une échelle logarithmique	12
1.5	Modèle des flux d'énergie à travers le PSII. (Tirée de Force et al., 2003).	12
2.1	Structure générale de la microcystine (MC). La position R ₁ et R ₂ est occupée par des acides aminés variables. (Tirée de Berry et al., 2008).	19
3.1	Schématisation de la compétition entre un perturbateur endocrinien et une hormone naturelle pour le récepteur et la réponse biologique entraînée par cette perturbation. (Tirée de Soares et al., 2008).	23
3.2	Structure moléculaire du nonylphénol. (Tirée de Sharma et al., 2009).	25
3.3	Structure moléculaire de l'octylphénol. (Tirée de Sharma et al., 2009).	26
3.4	Structure moléculaire du β-estradiol. (Tirée de Sigma-Aldrich Co, 2010).	27
4.1	Changes of photosynthetic efficiency measured by LuminoTox and expressed as percentage of control when <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC111 are exposed during 15 minutes to MC-LR (A), MC-RR (B), MC-LF (C) and MC-YR (D). * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).	59

4.2	Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC111 are exposed during 15 minutes to MC-LR (A), MC-RR (B), MC-LF (C) and MC-YR (D). * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).	60
4.3	Changes of photosynthetic efficiency measured by LuminoTox and expressed as percentage of control when <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC111 are exposed during 15 minutes to microcystin extracted from a culture of <i>Microcystis aeruginosa</i> CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).	61
4.4	Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC111 are exposed during 15 minutes to different concentrations of microcystin extracted from a culture of <i>Microcystis aeruginosa</i> CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).	62
4.5	Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when <i>Scenedesmus obliquus</i> CPCC5 (A), <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> CPCC37 (B) and <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC125 (C) are exposed during 15 minutes to various concentrations of microcystin extracted from a culture of <i>Microcystis aeruginosa</i> CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).	63
4.6	Comparaison of the inhibitory response (Ir) related to the PSII photochemical efficiency. Ir is expressed in percentage of inhibition of F_v/F_m and $(F_2-F_1)/F_2$ for PEA and LuminoTox respectively when <i>Chlorella vulgaris</i> CPCC111 are exposed to microcystin extracted from a culture of <i>Microcystis aeruginosa</i> CPCC299.	64
5.1	Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 5 ppm of 4-nonylphenol (○), plotted on a logarithmic time scale.	86
5.2	JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 5ppm of 4-nonylphenol and dark-adapted for 15 minutes.	87
5.3	Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 5 ppm of 4-octylphenol (○), plotted on a logarithmic time scale.	88

5.4	JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 5ppm of 4-octylphenol and dark-adapted for 15 minutes.	89
5.5	Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 4 ppm of β -estradiol (○), plotted on a logarithmic time scale.	90
5.6	JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 4ppm of β -estradiol and dark-adapted for 15 minutes.	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Liste des paramètres OJIP pouvant être calculés à partir des cinétiques de fluorescence rapide, avec leurs significations et leurs formules. (Élaboré à partir de Strasser et Strasser, 1995).	13
4.1	Listing of JIP-test parameters with the biological meaning and formulae calculated from the O-J-I-P fluorescence transient following the equations of Strasser and Strasser, 1995	65
5.1	Effective concentration ($p < 0.05$) at 10% of the control in $\mu\text{g/mL}$ for JIP-test parameters calculated from kinetics obtained for each species exposed to the different concentrations of each endocrine disrupter.	92

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4-NP	4-Nonylphenol
4-OP	4-Octylphenol
ABS	Absorption flux
ADP	Adénosine diphosphate
APE	Alkylphénol polyéthoxylates
ATP	Adénosine triphosphate
CC	Chlamydomonas Center
CEP	Complexe enzymatique photosynthétique
CPCC	Canadian Physiological Culture Center
DI	Dissipation flux
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E	Estradiol
ED	Endocrine disrupter
EPA	Agence de protection environnementale
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ET	Electron transport flux
F	Phénylalanine
F ₀	Fluorescence initiale mesurée à 50µs
F ₁	Fluorescence obtenue au LuminoTox avec une lumière d'excitation faible
F ₂	Fluorescence obtenue au LuminoTox avec une lumière d'excitation élevée
F _M	Valeur maximale de fluorescence
ICC	Indice de contamination chimique
L	Leucine
MC	Microcystine
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NP	Nonylphénol

NPEO	Nonylphénol éthoxylate
OEC	Complexe d'émission d'oxygène
O-J-I-P	Transition de phase de la fluorescence chlorophyllienne
OP	Octylphénol
OPEO	Octylphénol éthoxylate
P680	Correspond au photosystème II dont le maximum d'absorption est de 680nm
P700	Correspond au photosystème I dont le maximum d'absorption est de 700nm
PEA	Plant Efficiency Analyzer
pH	Potentiel hydrogène
PQ	Plastoquinone
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q _A	Quinone A
Q _B	Quinone B
Q _A ⁻ Q _B ²⁻	Quinones complètement réduites
R	Arginine
RC	Reaction center
SAPS	Système aqueux photosynthétique stabilisé
TR	Trapping flux
V _t	Relative variable fluorescence
Y	Tyrosine
β-E	β-Estradiol
Φ	Rendement photochimique

RÉSUMÉ

La pollution des milieux aquatiques est un problème majeur qui a des répercussions importantes au niveau récréatif et commercial, mais également sur la santé des populations humaines, animales et végétales. Les écosystèmes aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par une multitude de polluants provenant de sources anthropiques qui peuvent entraîner plusieurs conséquences directes ou indirectes. Le développement de tests rapides pour détecter les polluants aquatiques est essentiel afin d'évaluer le potentiel de risque d'un plan d'eau ou d'une source d'eau potable. L'objectif de mon mémoire a été d'évaluer l'efficacité des bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne de phytoplancton dans l'étude de problématiques environnementales émergentes telles que la prolifération des cyanobactéries toxiques et la pollution par les perturbateurs endocriniens. Les bioessais basés sur l'activité photosynthétique d'algues ont démontré une grande sensibilité à divers polluants. Or, ils n'ont jamais été utilisés avec les perturbateurs endocriniens et très peu pour les microcystines (MCs). Nous avons donc évalué si ces toxiques influencent l'efficacité photochimique et comment les flux d'énergie du photosystème II (PSII) sont affectés. Pour y parvenir, quatre algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella vulgaris*) ont été exposées à des standards de MC (variantes LF, LR, RR, YR) ainsi qu'à des extraits de MC provenant de culture de *Microcystis aeruginosa* CPCC299, une cyanobactérie toxique. Aussi, ces mêmes espèces (à l'exception de *C. vulgaris*) ainsi que deux souches de cyanobactéries, *M. aeruginosa* CPCC299 et CPCC632 ont été exposées aux perturbateurs endocriniens (4-octylphénol, 4-nonylphénol et β -estradiol). Des mesures de l'efficacité photochimique ont été effectuées à l'aide des fluorimètres PEA (*Hansatech Ltd.*) et LuminoTox (*Lab_Bell Inc.*). Nous avons démontré qu'en seulement 15 minutes d'exposition, les toxiques testés ont un effet significatif sur l'activité photosynthétique des organismes utilisées. Une différence de toxicité entre les standards de MC et une plus grande toxicité ont été mesurées pour l'extrait de MC comparativement à la toxine pure équivalente, soit MC-LR. Les trois perturbateurs endocriniens testés ont affecté les flux d'énergie du PSII des phytoplanctons exposés mais l'espèce *P. subcapitata* s'est avérée tolérante. De plus, les algues étudiées ont manifesté une sensibilité différente face aux toxiques testés, l'espèce la plus sensible face aux MCs et aux perturbateurs endocriniens étant respectivement *S. obliquus* et *M. aeruginosa* (CPCC632). Le choix de l'espèce est donc à considérer dans l'élaboration d'un bioessai sensible. Finalement, bien que le PEA s'est avéré moins sensible que le LuminoTox face aux MCs, il a permis d'obtenir de l'information sur le mode d'action des MCs au niveau du PSII. À la lumière de ces résultats, nous pouvons envisager l'utilisation des bioessais basés sur l'efficacité photochimique du phytoplancton pour détecter les MCs et les perturbateurs endocriniens dans un échantillon d'eau.

Mots clés : bioessais, photosynthèse, perturbateurs endocriniens, microcystines, phytoplancton.

PROBLÉMATIQUE

Depuis déjà plusieurs décennies, l'accroissement de la population, l'urbanisation ainsi que l'industrialisation font pression sur l'environnement. Les répercussions des activités humaines sur notre planète sont nombreuses et la pollution des milieux aquatiques est un problème majeur autant pour les humains, pour qui l'eau est une ressource essentielle, que pour la faune et la flore aquatique pour qui l'eau représente le milieu de vie. Plusieurs sources sont à l'origine de la pollution des milieux aquatiques telles que les rejets industriels, l'agriculture intensive et les activités domestiques (Kolpin *et al.*, 2002 ; Ralph *et al.*, 2007). Conséquemment, plusieurs écosystèmes aquatiques sont au prise avec une charge importante en divers composés qui entraînent une détérioration de ces milieux et perturbent la biocénose. Les milieux aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par une multitude de produits toxiques. Qu'il soit question de métaux, de déchets industriels, de pesticides ou de fertilisants, rares sont les milieux aquatiques exempts d'un de ces polluants (Kolpin *et al.*, 2002 ; Loos *et al.*, 2009 ; Rondeau, 2005).

À toutes ces sources de pollution bien connues s'ajoutent les polluants émergents. Les polluants émergents ne sont pas nécessairement nouveaux mais ont été récemment mis sous la loupe des chercheurs. Ils peuvent avoir été rejetés dans l'environnement depuis un certain temps mais leur présence et leurs effets n'ont été identifiés que récemment et souvent, de façon partielle (Petrovic et Barceló, 2006 ; Poynton et Vulpe, 2009 ; Richardson, 2009). Ce sont essentiellement des produits chimiques tels que des cosmétiques, des détergents ou des produits pharmaceutiques (hormones, antibiotiques, médicaments divers) connus ou suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (Kolpin *et al.*, 2002 ; Petrovic *et al.*, 2004 ; Richardson, 2009; Safe Drinking Water Foundation, 2010). Les concentrations environnementales des polluants émergents, leur dispersion, leurs interactions et leurs impacts sont ainsi encore mal identifiés (Farré *et al.*, 2008). La détection et l'étude des polluants émergents sont donc essentielles à la protection de l'environnement.

La pollution aquatique peut avoir un effet direct sur les organismes exposés ou entraîner des perturbations importantes d'un biotope. La perturbation des milieux aquatiques peut amener diverses conséquences menaçant l'équilibre des communautés aquatiques. Un phénomène qui prend de l'ampleur au Canada comme partout ailleurs dans le monde est la prolifération des cyanobactéries, communément appelées algues bleu-vert (Codd, 2000 ; Lavoie *et al.*, 2007). Les cas de floraisons de cyanobactéries ont lieu fréquemment dans les milieux enrichis en nutriments. Seulement au Québec en 2008, plus de 100 plans d'eau ont été touchés par une floraison de cyanobactéries et cela occasionne des répercussions importantes au niveau des activités récréatives, commerciales mais aussi au niveau de l'approvisionnement en eau (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs, 2009). Ces floraisons, aussi appelées «fleurs d'eau», peuvent également avoir des impacts importants sur la santé de la faune et des humains puisque certaines espèces sont capables de synthétiser des toxines (Codd *et al.*, 2005). La cyanotoxine qui est la plus fréquemment rencontrée est la microcystine (MC), une hépatotoxine qui compte plusieurs variantes (Babica, Bláha et Maršálek, 2006). Les cas d'intoxications par les cyanobactéries sont un phénomène rare mais qui semblent émergent mondialement puisque les floraisons de cyanobactéries sont de plus en plus fréquentes et envahissantes (Berry et Lind, 2010 ; Dörr *et al.*, 2010 ; Miller *et al.*, 2010). Cependant, ce ne sont pas toutes les espèces de cyanobactéries qui produisent des microcystines. De plus, les «fleurs d'eau» peuvent être dominées par une espèce de cyanobactéries mais peuvent également être composées de plusieurs espèces, résultant ainsi en un mélange complexe de cyanotoxines et de variantes. Il devient alors très complexe d'évaluer correctement la toxicité d'une floraison. Diverses analyses physico-chimiques permettent d'évaluer la toxicité d'un échantillon dans lequel il y a présence de cyanotoxines mais elles sont pour la plupart coûteuses, longues et complexes (Blaise, 1991 ; Törökné, Vasdinnyi et Asztalos, 2007). Or, l'évaluation des risques reliés à une floraison de cyanobactéries est essentielle et des méthodes efficaces et rapides pour la détection et l'estimation des cyanotoxines doivent être développées.

Il est donc primordial d'être bien outillé afin de faire face aux problématiques émergentes telles que la prolifération des cyanobactéries toxiques ou la pollution par les perturbateurs endocriniens afin de les détecter précocement. De plus, puisque les traitements d'eau

conventionnels (coagulation-floculation, sédimentation, chlorination) sont en général inefficaces pour enlever ces polluants (Lambert, Holmes et Hruddy, 1996 ; Stavrakakis *et al.*, 2008 ; Westrick, 2008 ; Westrick *et al.*, 2010), il est crucial d'avoir un outil efficace et rapide pour leur détection afin de ne pas les rejeter dans l'environnement mais surtout, pour s'assurer qu'ils ne contaminent pas l'eau potable. Les bioessais sont fréquemment utilisés afin de faire un «screening» initial d'un échantillon d'eau et ainsi évaluer s'il y a lieu d'effectuer d'autres analyses plus précises. Les bioessais basés sur la fluorescence de la chlorophylle *a* sont rapides et accessibles et il a été démontré qu'ils ont une grande sensibilité à plusieurs polluants tels que les herbicides ou les métaux (Eullaffroy *et al.*, 2009 ; Juneau et Popovic, 1999 ; Miles, 1990 ; Ralph *et al.*, 2007 ; Schreiber *et al.*, 2007).

Ce projet visait donc à évaluer si les bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne sont sensibles aux microcystines ainsi qu'aux perturbateurs endocriniens. L'efficacité, le seuil de détection ainsi que la sensibilité de deux fluorimètres ont été évalués pour la détection de microcystines et de trois perturbateurs endocriniens. Différentes espèces d'algues vertes ont également été utilisées comme organisme témoin afin d'évaluer leur sensibilité aux polluants testés et celles-ci ont été comparées afin de déterminer quelle espèce est idéale dans l'élaboration d'un bioessai pour la détection de cyanotoxines et de perturbateurs endocriniens.

CHAPITRE I

LES BIOESSAIS

1.1 Qu'est-ce qu'un bioessai?

Le contrôle de la qualité de l'eau dépend souvent d'analyses physico-chimiques. Les analyses chimiques et physiques peuvent évidemment indiquer la présence de composés toxiques dans l'eau mais elles demandent du temps, nécessitent un équipement spécialisé et une expertise, en plus d'être souvent dispendieuses (Blaise, 1991 ; Törökné, Vasdinnyi et Asztalos, 2007). De plus, elles ne donnent pas d'indication sur la biodisponibilité des composés toxiques ou sur les effets que peuvent engendrer une combinaison de plusieurs composés et ne renseignent donc pas sur leurs réels effets sur un écosystème (Klaassen, Amdur et Doull, 1996 ; McCarty et Borgert, 2006). Les bioessais permettent d'évaluer de façon qualitative ou quantitative l'effet toxique d'un échantillon sur divers organismes vivants tels les algues, les plantes, les invertébrés ou les poissons et tiennent compte de l'ensemble des contaminants présents (Paixão *et al.*, 2008). Ils sont donc un outil complémentaire dans l'évaluation de la toxicité d'un milieu et fournissent des indices sur les effets biologiques des toxiques présents, permettant ainsi d'orienter la gestion des risques associés à ce milieu (van der Grinten *et al.*, 2010).

Cependant, il est peu probable qu'un simple bioessai soit réceptif à tous les toxiques possiblement présents dans un échantillon. Si un seul biotest est utilisé, l'estimation de la toxicité reflètera seulement la sensibilité du test choisi. Le choix d'un tel bioessai peut s'avérer utile si le but est d'identifier une seule classe de contaminants mais peut cependant

entraîner une mauvaise estimation de la toxicité (Rojícková-Padrťová, Maršálek et Holoubek, 1998). À l'opposé, un bioessai sensible à une variété de contaminants permettra de vérifier la salubrité d'un environnement sans identifier les contaminants impliqués. C'est pourquoi une batterie de bioessais est largement recommandée afin d'augmenter la fiabilité des résultats et être suffisamment sensible aux différents toxiques possiblement présents dans un échantillon (Beauregard et Ridal, 2000; Fochtman, Raszka et Nierzedzka, 2000 ; Pandard *et al.*, 2006). La batterie de bioessais doit être représentative de l'écosystème entier et être ainsi idéalement composée de représentants de chaque maillon de la chaîne trophique, soit un organisme producteur, consommateur et décomposeur (Fochtman, Raszka et Nierzedzka, 2000 ; Rojícková-Padrťová, Maršálek et Holoubek, 1998). Cette batterie de tests doit idéalement être simple d'opération, sensible, reproductible, rapide et peu coûteuse (Blaise, 1998 ; Castillo et Schäfer, 2000).

Tel que mentionné précédemment, plusieurs organismes peuvent être utilisés afin de déterminer la toxicité d'un échantillon. Cependant, les algues ont largement été utilisées comme des indicateurs sensibles à différents polluants aquatiques et plusieurs auteurs ont démontré une plus grande sensibilité des algues comparativement aux invertébrés et aux poissons (Lewis, 1990, 1995 ; Paixão *et al.*, 2008 ; Rojícková-Padrťová et Maršálek, 1999). La sensibilité des tests de toxicité algaux dépend entre autres des espèces utilisées et de la méthode choisie.

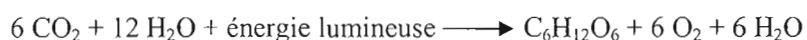
La photosynthèse constitue un processus qui est sensible aux variations des conditions environnementales. L'impact de plusieurs toxiques sur la photosynthèse est souvent notable avant que le soit un changement sur la croissance ou sur la mortalité, ce qui confère aux mesures de la photosynthèse un avantage important quant à la rapidité d'exécution et de traitement (Ralph *et al.*, 2007). Une méthode rapide qui permet d'obtenir des informations à la fois qualitative et quantitative sur la photosynthèse est la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a*. Les bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne offrent une grande sensibilité, plus élevée par exemple que celle des bioessais basés sur l'inhibition de la croissance (El Jay *et al.*, 1997). Ils ont également plusieurs autres avantages qui seront exposés dans la section suivante.

1.2 Les bioessais basés sur la fluorescence de la chlorophylle *a*

Plusieurs stress environnementaux tels que les herbicides, les métaux ou les surfactants peuvent affecter les processus photosynthétiques des organismes autotrophes. Avec la mesure de la fluorescence chlorophyllienne, l'inhibition de la photosynthèse ou la perturbation de processus biologiques reliés à celle-ci peuvent être évaluées et ainsi fournir une indication du stress environnemental. La mesure de la photosynthèse peut donc être un outil efficace afin de surveiller la présence de polluants environnementaux.

1.2.1 La photosynthèse

La photosynthèse est le processus physiologique qui permet la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. L'énergie produite par les réactions photochimiques dépendantes de la lumière est ensuite utilisée afin de réduire le dioxyde de carbone en composés glucidiques. C'est donc grâce à ce processus que les plantes, les algues et les autres organismes photoautotrophes tels que certaines bactéries et les cyanobactéries synthétisent de la matière organique. Le processus de la photosynthèse est représenté par l'équation suivante (Hopkins, 2003 ; Raven, Evert et Eichhorn, 2000 ; Taiz et Zeiger, 2006):



L'équation illustre la conversion du dioxyde de carbone et de l'eau, grâce à l'énergie solaire, en glucose, en eau et en oxygène.

La première étape de la photosynthèse se produit seulement en présence de lumière et est ainsi communément appelé phase claire ou photophosphorylation. Cette étape est effectuée par la chaîne photosynthétique de transport des électrons. Cette dernière est composée principalement de deux complexes plurimoléculaires appelés photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII) qui sont reliés par un troisième complexe polypeptidique nommé les cytochromes ainsi que par des transporteurs d'électrons (Hopkins, 2003 ; Raven, Evert et Eichhorn, 2000). Le PSI et le PSII sont aussi respectivement désignés par les termes P700 et P680 puisque le maximum d'absorption des centres réactionnels est soit de 700nm (PSI) ou de 680nm (PSII).

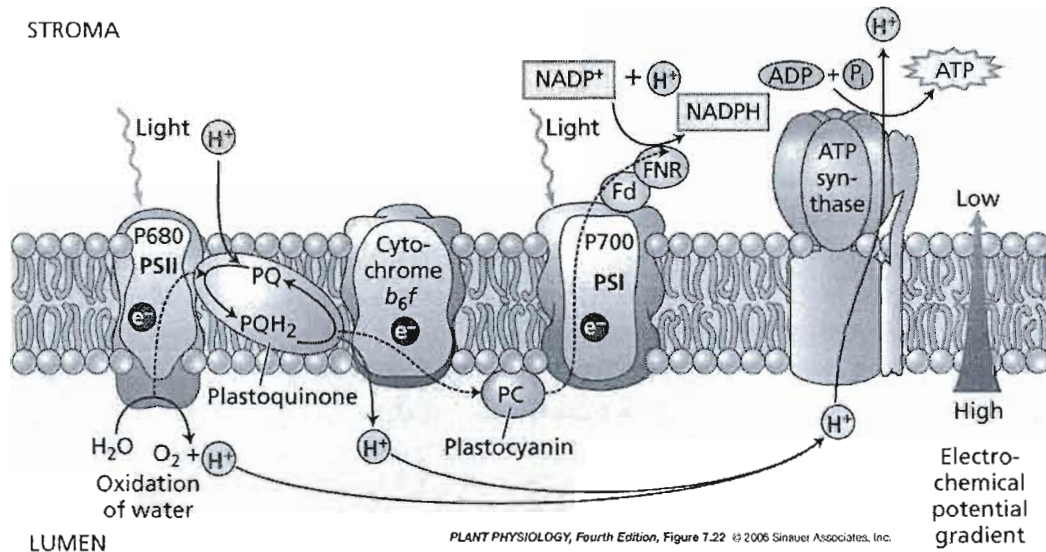
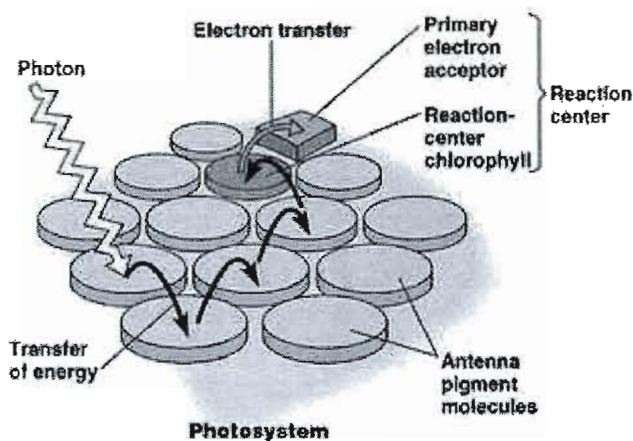


Figure 1.1 Schéma illustrant la structure de l'appareil photosynthétique et du transport des électrons. (Tirée de Taiz et Zeiger, 2006).

Chaque photosystème est associé à un complexe antennaire composé de divers pigments. Les pigments sont essentiels aux processus photosynthétiques puisque qu'ils absorbent les photons. La chlorophylle, les phycobilines ainsi que les pigments accessoires tels les caroténoïdes sont assemblés sous la forme d'une antenne qui absorbe les photons et canalise l'énergie d'excitation qui passe d'une molécule de chlorophylle à l'autre jusqu'au centre réactionnel schématisé à la figure 1.2 (Raven, Evert et Eichhorn, 2000 ; Taiz et Zeiger, 2006).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 1.2 Antenne associée au centre réactionnel de la chaîne de transport des électrons. (Tirée de Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

L'arrivée d'un photon excite ainsi le premier photosystème de la chaîne, le centre réactionnel P680 et le transport des électrons débute (voir figure 1.1). Les électrons proviennent de l'oxydation de l'eau qui est effectuée par le complexe d'émission d'oxygène (OEC), libérant subséquemment de l'oxygène et des protons. Sous sa forme excitée, P680* est alors rapidement photooxydé et il transfère un électron au premier accepteur, la phéophytine. Celle-ci cède rapidement son électron à des quinones (Q_A et Q_B) et aux plastoquinones (PQ). L'électron est ensuite déplacé vers le complexe cytochrome b_6f et transféré à une série de protéines pour finalement atteindre le centre réactionnel PSI, préalablement excité par un photon (Hopkins, 2003 ; Huner, Öquist et Melis, 2003). L'électron est en dernier lieu transféré à la ferrédoxine, ce qui mène à la réduction du $NADP^+$ en NADPH. La photophosphorylation entraîne donc une production de NADPH et la création d'un gradient de protons disponible pour alimenter l'ATP synthétase. Un pore traverse ce complexe enzymatique par lequel s'écoulent les électrons pour retourner au stroma et l'énergie ainsi libérée permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate. Il est à noter que deux photons doivent être absorbés et par le PSII et par le PSI pour réduire une molécule de $NADP^+$ en NADPH et ainsi produire un atome d'oxygène.

L'ATP et le NADPH produits sont ensuite utilisés pour la réduction du carbone dans le cycle de Calvin, un processus non photo-dépendant aussi appelé phase sombre. C'est par le biais

d'une série de réactions impliquant diverses enzymes que le dioxyde de carbone est fixé pour former une molécule de sucre à trois carbones. L'énergie qui actionne le cycle de carbone est ainsi fournie par la photophosphorylation.

Chez les cyanobactéries, étant dépourvues d'organite, les processus physiologiques de la photosynthèse et de la respiration sont intimement reliés (Campbell *et al.*, 1998 ; Taiz et Zeiger, 2006). De plus, les cyanobactéries possèdent des phycobilipigments liés à des protéines et qui forment une structure macromoléculaire appelée phycobilisome. Les principaux phycobilipigments sont la phycoérythrine, la phycocyanine et l'allophycocyanine (Grossman *et al.*, 1993 ; Hankamer *et al.*, 2001). Le phycobilisome correspond au complexe antennaire des cyanobactéries et est donc associé au centre réactionnel du PSII. Il permet l'absorption de la lumière dans un plus large spectre et son transfert à la chlorophylle (Falkowski et Raven, 2007 ; Grossman *et al.*, 1993 ; Hankamer *et al.*, 2001).

1.2.2 La fluorescence chlorophyllienne

La mesure de la photosynthèse est un bon indicateur de l'état physiologique d'un organisme photoautotrophe soumis à un stress environnemental. Divers paramètres reliés à la photosynthèse peuvent donc être mesurés tels la formation d'ATP, la fixation du CO₂ ou le dégagement d'O₂. Or, ces méthodes sont complexes et plutôt longues à réaliser (Juneau, Qiu et Deblois, 2007). Une technique tout aussi sensible mais plus rapide et accessible est la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. En plus de démontrer la toxicité, elle peut également donner un indice sur le mode d'action d'un toxique (Bi Fai, Grant et Reid, 2007).

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne est en effet une façon simple et rapide d'évaluer l'activité photosynthétique des cyanobactéries, des algues et des plantes supérieures. Elle est principalement utilisée afin d'évaluer l'effet des herbicides mais est également applicable pour divers facteurs environnementaux (Chen, Juneau et Qiu, 2007 ; Juneau *et al.*, 2001 ; Juneau, Qiu et Deblois, 2007 ; White et Critchley, 1999). La fluorescence permet de mesurer de quelle façon un organisme photosynthétique utilise l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle. Lorsqu'un photon est absorbé par une

molécule de chlorophylle, l'énergie est transférée de molécule en molécule. Cette énergie d'excitation peut suivre quatre chemins tel qu'illustré à la figure 1.3: (1) atteindre le centre réactionnel et être transférée dans la chaîne de transport des électrons pour ultimement fixer du carbone, (2) être dissipée sous forme de chaleur, (3) être réémise à une longueur d'onde légèrement plus longue sous forme de fluorescence ou (4) entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Campbell *et al.*, 1998 ; Müller, Li et Niyogi, 2001 ; Ralph *et al.*, 2007).

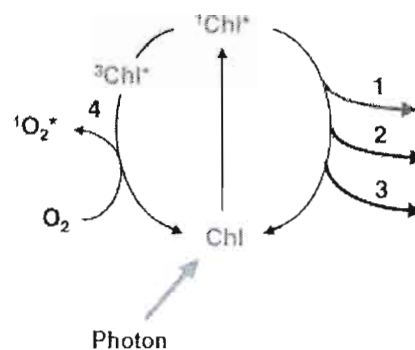


Figure 1.3 Voies de dissipation d'énergie de l'état singulet excité de la chlorophylle ($^1\text{Chl}^*$) du PSII. L'énergie peut être utilisée pour la photochimie (1), dissipée sous forme de chaleur (2), réémise sous forme de fluorescence (3) ou produire des espèces réactives de l'oxygène (4). (Modifié de Müller *et al.*, 2001).

Ces voies étant interliées, un changement dans l'une de ces voies de dissipation amènera obligatoirement une modification à un autre niveau. Par exemple, une diminution de la photochimie (voie 1) peut amener une hausse de la dissipation sous forme de fluorescence. La mesure de cette fluorescence permet d'évaluer le taux de performance photosynthétique et reflète ainsi l'état de l'appareil photosynthétique (Maxwell et Johnson, 2000 ; Ralph *et al.*, 2007). Un changement dans la fluorescence chlorophyllienne suite à l'exposition d'un organisme photosynthétique à un toxique peut être mesuré et ainsi fournir une indication concernant son impact sur les processus photosynthétiques.

Au cours des 20 dernières années, les techniques de mesure de la fluorescence n'ont cessé de se perfectionner et c'est maintenant une méthode rapide, extrêmement sensible et non invasive (Ralph *et al.*, 2007 ; Samson, Prášil et Yaakoubd, 1999 ; White et Critchley, 1999). Elle peut permettre à la fois de surveiller la santé d'organismes photosynthétiques dans des écosystèmes pollués et de détecter la présence de toxiques dans un échantillon d'eau utilisant ainsi la fluorescence chlorophyllienne comme un biosenseur (Ralph *et al.*, 2007). Les fluorimètres sont les appareils désignés pour mesurer un tel changement dans la fluorescence et plusieurs sont maintenant disponibles. Afin de réaliser les bioessais basés sur l'activité

photosynthétique d'algues, deux fluorimètres seront utilisés soit le Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) et le LuminoTox (Lab_Bell Inc., Shawinigan, Quebec, Canada). L'efficacité et la sensibilité de ces deux appareils seront donc évaluées au cours du projet.

1.2.3 Le Plant Efficiency Analyzer (PEA)

Le fluorimètre PEA (Hansatech Ltd.) permet d'analyser l'état du transport des électrons et focalise sur la réduction des quinones (Ait Ali, 2008 ; Force, Critchley et Van Rensen, 2003 ; Strasser, Srivastava et Tsimilli-Michael, 2000 ; Strasser et Strasser, 1995). Une cinétique rapide et polyphasique est obtenue en une à six secondes et permet d'identifier à quel endroit un toxique affecte le PSII. Cet appareil est largement utilisé dans les études de toxicité des herbicides sur les plantes dont la concentration est corrélée avec une inhibition du transport des électrons (Juneau, Qiu et Deblois, 2007). Le PEA mesure une élévation rapide de la fluorescence en réponse à un flash de lumière saturante. À partir de la valeur initiale (F_0) mesurée à 50 μ s, l'intensité de la fluorescence atteint sa valeur maximale (F_M) en moins d'une seconde. L'appareil prend des mesures à intervalles réguliers ce qui permet de tracer une courbe qui reflète le transport des électrons de l'eau au pool de plastoquinones (Krause et Jahns, 2003 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). Lorsque présentée sur une échelle logarithmique, la cinétique obtenue exhibe plusieurs transitions de phase nommée O, J, I et P. Ces transitions représentent les différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII, illustrés à la figure 1.4.

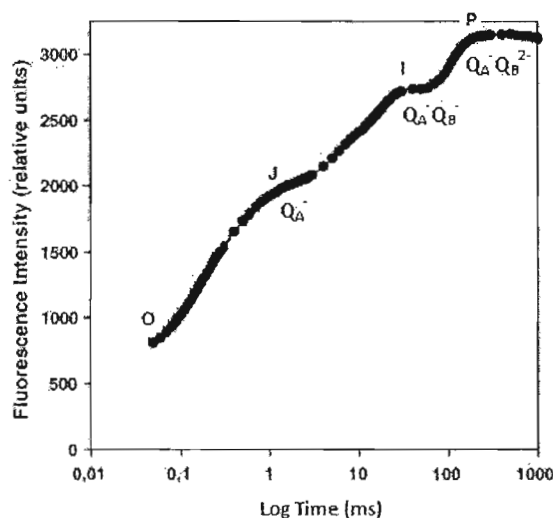


Figure 1.4 Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne présentant les transitions O-J-I-P, exprimée sur une échelle logarithmique. (élaborée d'après mes résultats)

La phase O-J représente la réduction de l'accepteur primaire Q_A et J (fluorescence à 2 ms) représente donc l'état d'oxydo-réduction de Q_A^- . La montée de J à I (fluorescence à 30 ms) indique la fermeture des centres réactionnels du PSII qui étaient encore ouverts, résultant en l'accumulation de $Q_A^- Q_B^-$ (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995 ; Strasser et Strasser, 1995). La fluorescence maximale (P) est atteinte lorsque le pool de plastoquinones est complètement réduit et la transition de I à P représente donc l'accumulation de $Q_A^- Q_B^{2-}$ (Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995 ; Vredenberg, 2000).

Un changement dans l'amplitude et la pente de la courbe est indicateur de l'effet d'un toxique (Ralph *et al.*, 2007). Plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir des cinétiques obtenues afin d'évaluer les flux d'énergie à travers le centre réactionnel du PSII schématisé à la figure 1.5 (Strasser et Strasser, 1995). L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle correspond à l'*absorption flux* (ABS), l'énergie piégée par le centre réactionnel du PSII correspond au *trapping flux* (TR), l'énergie dirigée vers la

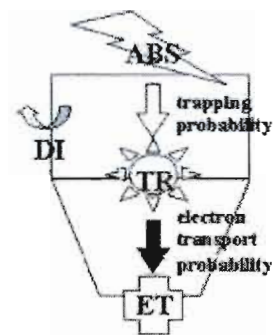


Figure 1.5 Modèle des flux d'énergie à travers le PSII. (Tirée de Force *et al.*, 2003).

chaîne de transport des électrons correspond au *electron transport flux* (ET) alors que le *dissipation flux* (DI) correspond à l'énergie non-piégée par le centre réactionnel et dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence (Force, Critchley et Van Rensen, 2003 ; Strasser et Strasser, 1995).

Le PEA permet de mesurer la fluorescence à chaque μs , sur une échelle de temps de 10 μs à 1 s, permettant ainsi de générer une cinétique de fluorescence détaillée. Plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir de ces cinétiques et ont été utilisés afin d'évaluer les résultats obtenus au cours de cette maîtrise. Les paramètres ainsi que leurs significations et leurs formules sont présentés dans le tableau présenté ci-dessous.

Tableau 1.1 Liste des paramètres OJIP pouvant être calculés à partir des cinétiques de fluorescence rapide, avec leurs significations et leurs formules. (Élaboré à partir de Strasser et Strasser, 1995).

Paramètres	Signification et formules
O	Fluorescence à 50 μs
J	Fluorescence à 2 ms
I	Fluorescence à 30 ms
P ou F_M	Fluorescence maximale
F_V	Fluorescence variable maximale ($F_M - F_{50\mu\text{s}}$)
M_0	Taux net de fermeture des centres réactionnels du PSII, $4 * (F_{300\mu\text{s}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}})$
F_V / F_M ou TR_0 / ABS	Rendement photochimique maximale du PSII ou probabilité de piégeage, $(F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M$
ABS / RC	Taille effective de l'antenne d'un centre réactionnel actif, $(TR_0 / \text{RC}) / TR_0 / \text{ABS}$
ET_0 / RC	Taux de transport des électrons dans un centre réactionnel actif, $(TR_0 / \text{RC}) * (ET_0 / TR_0)$
ET_0 / TR_0	Probabilité de transport des électrons, $(1 - V_J)$ où $V_J = (F_{2\text{ms}} - F_{50\mu\text{s}}) / (F_M - F_{50\mu\text{s}})$
TR_0 / RC	Taux maximal de piégeage, M_0 / V_J
DI_0 / RC	Dissipation effective d'un centre réactionnel actif, $(\text{ABS} / \text{RC}) - (TR_0 / \text{RC})$

Ces divers paramètres reflètent les changements dans la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique et sont des indicateurs sensibles du stress subi par les algues (Roháček et Barták, 1999).

1.2.4 Le LuminoTox

Le LuminoTox (*Lab_Bell inc.*) est un appareil récent et initialement développé afin de déterminer rapidement un indice de contamination chimique (ICC) d'un échantillon d'eau. Il est largement utilisé afin de contrôler l'eau potable ou pour évaluer la toxicité d'effluents d'eaux usées provenant de milieux industriels, agricoles ou de sites d'enfouissement et également pour valider les systèmes de traitement des eaux usées (Bellemare *et al.*, 2006 ; Dellamatrice *et al.*, 2006 ; Lab_Bell, 2007). L'ICC est calculé à partir de l'inhibition de la fluorescence provenant de l'activité photosynthétique des systèmes biologiques utilisés. La toxicité d'un échantillon peut être évaluée en utilisant soit des systèmes aqueux photosynthétiques stabilisés (SAPS) ou des complexes enzymatiques photosynthétiques (CEPs). Les SAPS sont des algues entières (*Chlorella vulgaris*) alors que les CEPs sont des membranes de thylakoïdes isolées à partir de feuilles d'épinard. Les contaminants chimiques ont accès directement aux sites d'inhibition des membranes photosynthétique qui constituent les CEPs alors que les SAPS sont plus sélectifs à l'entrée des contaminants puisque ceux-ci doivent traverser la paroi et la membrane externe des algues (Lab_Bell, 2007).

Le LuminoTox est un appareil simple et sensible qui tient compte de l'ensemble des contaminants présents dans un échantillon (Lab_Bell, 2007). Comme il amplifie la variation dans le signal de fluorescence, il permet une courte période d'exposition de 12 à 15 minutes, comparativement à une exposition de 3 à 24 heures pour d'autres fluorimètres. Néanmoins, la sensibilité du test augmente avec le temps d'exposition (Environnement Canada, 2009). Le LuminoTox permet de mesurer le rendement photochimique (Φ) selon la formule suivante:

$$\Phi = (F_2 - F_1) / F_2$$

La fluorescence F_2 correspond aux quinones complètement réduites ($Q_A^-Q_B^{2-}$) suite à l'application d'une lumière d'excitation élevée alors que la fluorescence F_1 correspond aux quinones complètement oxydées suite à l'application d'une lumière de faible intensité (Bellemare *et al.*, 2006 ; Dellamatrice *et al.*, 2006 ; Environnement Canada, 2009 ; Lab_Bell, 2007). L'efficacité photochimique du témoin est premièrement mesurée et calculé selon la formule :

$$\Phi_{\text{témoin}} = (F_2 \text{ témoin} - F_1 \text{ témoin}) / F_2 \text{ témoin}$$

Et ensuite, l'efficacité photochimique relative de l'échantillon (SAPS ou CEPs traités avec l'échantillon) est ensuite calculée par rapport à la mesure F_2 du témoin, selon:

$$\Phi_{\text{échantillon}} = (F_2 \text{ échantillon} - F_1 \text{ échantillon}) / F_2 \text{ témoin}$$

Un pourcentage d'inhibition est par la suite calculé en fonction du témoin selon la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\Phi_{\text{témoin}} - \Phi_{\text{échantillon}}) / \Phi_{\text{témoin}}] \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition peut être utilisé tel quel ou traité statistiquement afin de générer une courbe dose-réponse, déterminer des indices ou des unités de toxicité (Environnement Canada, 2009 ; Lab_Bell, 2007).

Le LuminoTox constitue donc un appareil qui permet la détection de toxiques aqueux de façon rapide et dont la sensibilité est comparable et parfois plus élevée que celle d'autres bioessais (Bellemare *et al.*, 2006 ; Debenest *et al.*, 2010). Cependant, cet appareil ne permet pas d'identifier le site d'action du toxique puisqu'il ne donne que la valeur F_2 et F_1 et ne génère donc pas de cinétique de fluorescence. S'il y a une inhibition avec l'utilisation des CEPs, il est néanmoins possible d'émettre l'hypothèse que le toxique cible les premiers constituants de la chaîne de transport des électrons puisque le processus d'extraction des CEPs dégrade les constituants situés à la fin du complexe photosynthétique (Bellemare *et al.*, 2006 ; Environnement Canada, 2005).

CHAPITRE II

LES CYANOBACTÉRIES ET LES MICROCYSTINES

2.1 Les cyanobactéries

Le groupe des cyanobactéries est l'un des plus diversifié des procaryotes photosynthétiques, regroupant plus de 2000 espèces réparties en 150 genres (Briand *et al.*, 2003). Les cyanobactéries sont des microorganismes dépourvus de noyau et d'organite et ne possédant qu'une membrane cellulaire. Toutefois, elles se distinguent des bactéries par leur appareil photosynthétique. Elles sont principalement aérobiques mais prolifèrent également en conditions anaérobiques et peuvent ainsi croître dans divers habitats (Wiegand et Pflugmacher, 2005).

Les cyanobactéries sont des organismes unicellulaires dont la taille varie entre trois et dix micromètres. Or, elles peuvent s'agréger en colonies irrégulières dont la morphologie varie selon les conditions de croissance (Svrcek et Smith, 2004). La photosynthèse est leur principal mode de production d'énergie et elles possèdent une pigmentation diversifiée. En effet, en plus de la chlorophylle, elles synthétisent d'autres pigments telles la phycocyanine, la phycoérythrine et l'allophycocyanine qui leur permettent de capter les photons sur un spectre de longueur d'onde étendu. De plus, elles s'adaptent à la lumière à laquelle elles croissent en modifiant la composition en pigment dans leurs complexes antennaires (Visser *et al.*, 2005). Ces caractéristiques permettent aux cyanobactéries d'exploiter plus efficacement les diverses longueurs d'onde du spectre de la lumière. En plus d'être efficaces pour la photosynthèse, elles ont également développé des mécanismes pour se protéger des rayons

ultraviolets tels que la synthèse de pigments photoprotecteurs comme les caroténoïdes. Ceux-ci protègent les pigments de la photooxydation en absorbant l'excès de lumière et protègent également de la destruction par les radicaux actifs de l'oxygène (Huner, Öquist et Melis, 2003 ; Payne *et al.*, 2000). D'autres caractéristiques spécifiques confèrent un avantage aux cyanobactéries. Plusieurs espèces ont la capacité de migrer verticalement dans la colonne d'eau grâce à leurs vacuoles gazeuses. Elles peuvent ainsi se déplacer pour aller capter ou éviter la lumière, ou aller chercher les nutriments disponibles (Visser *et al.*, 2005). Certaines espèces de cyanobactéries ont aussi la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à l'enzyme nitrogénase présente dans les hétérocystes. Cette aptitude permet une autonomie remarquable pour combler les besoins de la cellule lorsqu'il y a privation en nitrate ou en ammonium. Les cyanobactéries peuvent aussi faire des réserves de phosphore sous forme de granules de polyphosphates. Finalement, elles ont la possibilité d'entrer en dormance sous forme de spores ou d'akinètes, ce qui leur permet de survivre pendant plusieurs années si les conditions externes ne sont pas favorables (Adams, 2000 ; Adams et Duggan, 1999). Bref, toutes ces nombreuses caractéristiques font des cyanobactéries des compétiteurs supérieurs à plusieurs autres espèces d'algues et leur permettent de coloniser et de dominer plusieurs milieux aquatiques.

2.2 Les floraisons de cyanobactéries

Les floraisons résultent d'une phase de prolifération en masse des cyanobactéries et se produisent lorsque les apports en nutriments sont importants. Depuis l'ère industrielle, la charge en nutriments comme le phosphore aurait augmentée de plus de 10 fois dans les rivières alors que les apports en azote seraient encore plus grands (Maso et Garces, 2006). Ces conditions viennent perturber l'équilibre entre les diverses communautés de phytoplanctons et favorisent ainsi la croissance d'espèces opportunistes telles les cyanobactéries (Lavoie *et al.*, 2007). Il en résulte une accumulation de biomasse qui peut être composée majoritairement d'une espèce ou d'une combinaison de plusieurs espèces. Ces floraisons, communément appelées «fleurs d'eau» entravent les activités récréatives et commerciales puisqu'elles diminuent la clarté de l'eau, occasionnent de mauvaises odeurs et un mauvais goût. Mais surtout, elles peuvent avoir des impacts importants sur la santé

puisque certaines espèces synthétisent des toxines (Kardinaal et Visser, 2005). Des 2000 espèces de cyanobactéries identifiées, 40 ont été reconnues comme étant toxiques (Briand *et al.*, 2003). Ainsi, une floraison de cyanobactéries peut être composée d'espèces non toxiques ou toxiques ou d'une combinaison des deux. De plus, au sein d'une même espèce de cyanobactéries, les variantes en cyanotoxines peuvent être multiples ce qui complexifie l'évaluation de la toxicité d'une «fleurs d'eau».

2.3 Les cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des métabolites secondaires, c'est-à-dire des molécules qui ne sont pas utilisées pour le métabolisme primaire de l'organisme (Carmichael, 1992). Les toxines produites par les cyanobactéries sont regroupées en quatre groupes fonctionnels : les hépatotoxines, les neurotoxines, les dermatotoxines et cytotoxines, et finalement, les endotoxines. Ces toxines sont essentiellement à l'intérieure de la cellule et sont relâchées dans l'environnement lors de la lyse cellulaire (Wiegand et Pflugmacher, 2005). Le groupe des hépatotoxines comprend les microcystines, les nodularines et les cylindrospermopsines qui sont synthétisées par plus de douze genres différents. Ces toxines s'accumulent dans le foie après l'absorption (Lovell *et al.*, 1989 ; Runnegar *et al.*, 1987) et induisent ainsi des lésions importantes au niveau de cet organe causant entre autres, des vomissements ou de la diarrhée, et pouvant même entraîner la mort en cas d'hémorragie hépatique (Carmichael, 1992). Les microcystines sont les plus répandues et les plus étudiées mondialement. Les neurotoxines (anatoxines, saxitoxines) occasionnent des troubles neurologiques alors que les dermatotoxines et cytotoxines (lyngbyatoxines, aplysiatoxines) provoquent des irritations de la peau et des réactions inflammatoires (Codd *et al.*, 2005 ; Wiegand et Pflugmacher, 2005). Finalement, les endotoxines correspondent aux lipopolysaccharides (LPS) qui sont un composant majeur de la paroi cellulaire des cyanobactéries. Ils sont responsables de plusieurs effets physiologiques sévères tels de la fièvre, des troubles gastro-intestinaux et ils peuvent entraîner une défaillance de multiples organes et un choc septique (Papageorgiou *et al.*, 2004 ; Stewart, Schluter et Shaw, 2006).

2.3.1 La microcystine (MC)

La microcystine (MC) est la toxine la plus fréquemment rencontrée lors d'épisode de floraison et elle compte plus de 70 variantes (Babica, Bláha et Maršálek, 2006 ; Spoof *et al.*, 2003). Les MCs sont des heptapeptides cycliques (voir figure 2.1) constitués d'un enchaînement d'acides aminés qui peuvent être substitués en deux endroits précis (R_1 et R_2) par des acides aminés tels que la leucine (L), l'arginine (R) ou la tyrosine (Y). Cette substitution permet ainsi de faire la distinction entre les variantes. Par exemple, chez la microcystine-LR, la position R_1 est occupée par la leucine alors que R_2 est occupée par l'arginine (Berry *et al.*, 2008 ; Carmichael *et al.*, 1988 ; Van Apeldoorn *et al.*, 2007). De plus, les MCs sont composées d'un acide aminé caractéristique, l'acide 3-amino-9-méthoxy-2-6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-dinéoïque communément appelé Adda. Cet acide aminé est essentiel à la toxicité des MCs, puisqu'il inhibe les protéines phosphatases en se liant de façon covalente à la partie catalytique de l'enzyme (An et Carmichael, 1994 ; Harada, 1996 ; Harada *et al.*, 2004). Les phosphatases sont des enzymes régulatrices de l'activité cellulaire et leur inhibition entraîne des dysfonctions métaboliques qui peuvent ultimement causer la lyse cellulaire (MacKintosh *et al.*, 1990 ; Toivola *et al.*, 1997 ; Yoshizawa *et al.*, 1990).

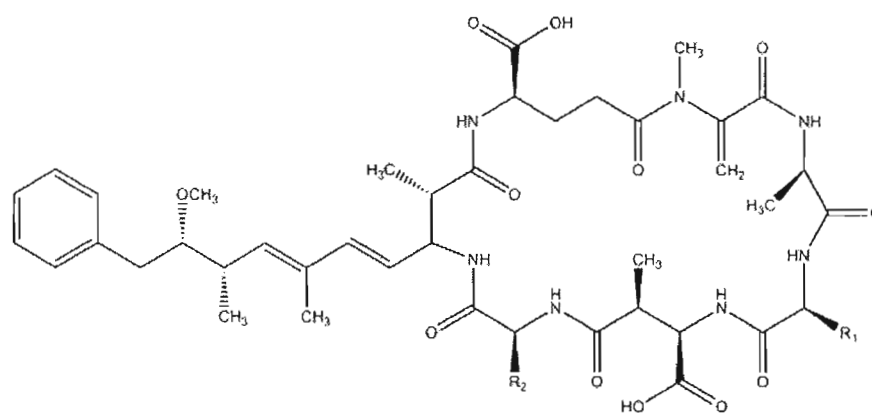


Figure 2.1. Structure générale de la microcystine (MC). La position R_1 et R_2 est occupée par des acides aminés variables. (Tirée de Berry *et al.*, 2008).

Comme les toxines sont essentiellement confinées à l'intérieur des cellules, les concentrations aquatiques les plus élevées en MCs sont détectées durant la sénescence et la

décomposition des «fleurs d'eau» (Park *et al.*, 1998). Cela se produit principalement en octobre mais peut se produire tout au long de la saison estivale, dépendamment des conditions environnementales et de la teneur en nutriments dans le milieu. Toutefois, elles peuvent être détectées dans l'environnement en début de floraison puisqu'une certaine perte et de la lyse cellulaire ont lieu continuellement (Sedmak et Elsersek, 2006). Les concentrations en cyanobactéries lors de floraison peuvent atteindre 250 000 cellules/mL associées à une concentration extracellulaire en microcystine de 1,0 à 80 µg/L (Carmichael, 1997 ; Lahti *et al.*, 1997 ; Svrcek et Smith, 2004). Or, des concentrations dépassants 300 µg/L ont été rapportées lors de floraisons très denses (Fastner *et al.*, 1999 ; Murphy *et al.*, 2003 ; Welker *et al.*, 2005). Les doses létales 50 (LD₅₀) de MCs varient entre 50 et 11000 µg/kg dépendamment de la variante, de l'espèce exposée et de la route d'administration. Chez le cochon, la LOAEL (lowest observed adverse effect level) pour la MC-LR est de 100 µg/kg/jour et de 50 µg/kg/jour chez le rat (Falconer *et al.*, 1994 ; Fawell *et al.*, 1999).

Les routes d'exposition aux microcystines sont nombreuses et peuvent se faire par exemple par l'ingestion orale d'eau contaminée, l'inhalation (aérosol ou poussière de cyanobactéries séchées), le contact avec la peau, l'ingestion d'aliments contaminés ou même l'hémodialyse (Codd *et al.*, 1999). En effet, pour cette dernière voie d'exposition, en 1996 au Brésil, 76 patients d'une clinique de dialyse sont décédés et l'analyse de l'eau ayant servi aux traitements a révélée la présence de cyanotoxines (Carmichael *et al.*, 2001 ; Pouria *et al.*, 1998). Même si les cas de mortalité humaine causés par une exposition aux cyanotoxines sont rares, les malaises et intoxications par les cyanobactéries semblent être un phénomène émergent au niveau mondial, les floraisons de cyanobactéries étant de plus en plus fréquentes et envahissantes. De plus, plusieurs cas de toxicoses ont été recensés chez les animaux sauvages et domestiques variant de réactions modérées à fatales (Codd, Morrison et Metcalf, 2005 ; Matsunaga *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2010 ; Stewart, Seawright et Shaw, 2008).

Il est important de mentionner qu'en général, les concentrations en cyanotoxines sont reliées à la biomasse, elle-même influencée par plusieurs facteurs abiotiques et biotiques telles l'intensité lumineuse, la température, la disponibilité en nutriments ou la pression des

prédateurs (Izydorczyk *et al.*, 2008 ; Wilson, Wilson et Hay, 2006). Or, le lien entre une floraison de cyanobactéries et la concentration en toxine n'est pas toujours établi. Tout d'abord, au sein d'une même espèce de cyanobactérie, certaines souches peuvent avoir les gènes codants pour les toxines alors que d'autres non. Aussi, il y a une hétérogénéité dans les sous-populations productrices de toxines quant à leur niveau de toxicité. Ceci peut être relié à une différence au niveau de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces molécules (Kaebernick et Neilan, 2001 ; Kardinaal et Visser, 2005). Les concentrations en toxines sont donc difficiles à prévoir lors de floraison. Par conséquent, puisque les «fleurs d'eau» ne sont pas toujours synonymes de toxicité, l'évaluation du risque ainsi que la prise de décision visant la protection publique ne peuvent être uniquement basés sur le dénombrement cellulaire ou l'identification des cyanobactéries.

CHAPITRE III

LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

3.1 Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien?

Les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes qui interfèrent avec les fonctions du système endocrinien et qui provoquent ainsi des effets nocifs sur l'organisme lui-même ou sur ses descendants (European Commission, 1997 ; Comité de la prévention et de la précaution, 2003). Deux grandes classes de substances causant une perturbation du système endocrinien peuvent être identifiées. En premier lieu, les substances naturelles qui incluent les hormones sexuelles naturelles telles que l'estrogène, la progestérone ou la testostérone et les phytoestrogènes. Ensuite, les substances synthétiques, qui incluent les hormones synthétiques telles que le 17 α -éthynylestadiol et les produits chimiques et leurs sous-produits comme les pesticides ou les agents nettoyants (Clara *et al.*, 2004). Les perturbateurs endocriniens agissent à des doses très faibles et peuvent affecter directement un organe endocrinien ou interagir avec des récepteurs hormonaux et ainsi affecter plusieurs mécanismes importants tels que la croissance, le développement, la reproduction ou même le comportement. Ils ont la propriété de mimer les hormones et ainsi d'agir comme agoniste ou antagoniste de celles-ci et de compétitionner pour le récepteur de l'hormone naturelle schématisé à la figure 3.1. Ils peuvent également interférer avec la synthèse, le relâchement, le transport ou le métabolisme d'hormones endogènes (Isidori *et al.*, 2006 ; Soares *et al.*, 2008 ; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006).

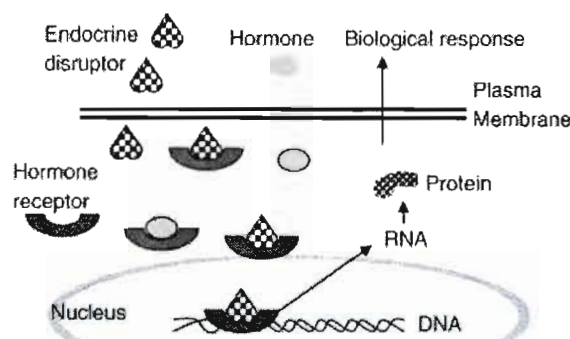


Figure 3.1 Schématisation de la compétition entre un perturbateur endocrinien et une hormone naturelle pour le récepteur et la réponse biologique entraînée par cette perturbation. (Tirée de Soares et al., 2008).

La présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement suscite beaucoup d'inquiétudes puisque depuis les deux dernières décennies, de nombreux problèmes importants associés aux perturbateurs endocriniens ont été rapportés. Ces perturbateurs seraient responsables de changements dans le «sex-ratio» des naissances (Drastichová *et al.*, 2005 ; Figà-Talamanca, Tarquini et Lauria, 2003 ; Haebe *et al.*, 2008), de plusieurs malformations génitales, de la puberté précoce, de la baisse de la fertilité (Lemaire *et al.*, 2004 ; Phillips et Tanphaichitr, 2008 ; Virtanen *et al.*, 2005), de l'augmentation du nombre de cancers (Aydogan et Barlas, 2006 ; Fénichel et Brucker-Davis, 2008 ; Nori *et al.*, 2006) ainsi que de l'obésité (Grün et Blumberg, 2009 ; Grün *et al.*, 2006). De plus, la majorité des perturbateurs endocriniens sont persistants et ont un potentiel de bioaccumulation important (Gadzala-Kopciuch *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2010 ; Riva *et al.*, 2010 ; Takahashi *et al.*, 2003 ; Takamatsu, Goto et Abe, 2009).

L'industrialisation, les rejets d'eaux usées ainsi que l'agriculture contribuent grandement à la présence de ces perturbateurs dans les milieux aquatiques. Seulement au Québec, plusieurs équipes de scientifiques ont mesuré récemment des concentrations inquiétantes pour la faune aquatique de divers contaminants, dont plusieurs agiraient comme perturbateurs endocriniens (Aravindakshan et Cyr, 2005 ; Cathum et Sabik, 2001 ; Gagné *et al.*, 2001 ; Garcia-Ac *et al.*,

2009). Des produits pharmaceutiques ainsi que divers herbicides ont été mesurés dans l'eau de surface du fleuve St-Laurent et d'autres rivières québécoises. Les concentrations sont beaucoup plus importantes au niveau de l'eau de surface adjacente à des sites de rejet des eaux usées traitées de Montréal et comme plusieurs de ces contaminants ont une grande polarité, ils ont le potentiel d'être transportés et dispersés dans l'environnement aquatique (Aravindakshan et Cyr, 2005 ; Garcia-Ac *et al.*, 2009 ; Viglino *et al.*, 2008a).

3.2 Le nonylphénol

Le nonylphénol (NP) résulte de la transformation microbienne des alkylphénol polyéthoxylates (APEs), une classe importante de surfactants non-ioniques (Ahel, Giger et Koch, 1994 ; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006 ; Ying, Williams et Kookana, 2002). Les APEs sont utilisés dans les produits de nettoyage domestique et industriel, dans la peinture, les herbicides, les pesticides ainsi que dans la production de papier et de textile (Isidori *et al.*, 2006 ; Nimrod et Benson, 1996 ; Wang et Xie, 2007). La production mondiale en APEs était approximativement de 500 000 tonnes en 1997, et le nonylphénol éthoxylate (NPEOs) représente environ 80% de cette production totale (Andrew *et al.*, 2008 ; Brook *et al.*, 2005 ; Renner, 1997) alors que l'octylphénol éthoxylate (OPEOs) en représente 20% (Andrew *et al.*, 2008 ; Brook *et al.*, 2005). Conséquemment à cette production importante, les APEs atteignent les milieux aquatiques en quantités considérables, principalement par les rejets municipaux et industriels d'eaux usées (Bennie, 1999 ; Céspedes *et al.*, 2008 ; Isidori *et al.*, 2007 ; Servos *et al.*, 2003). Les APEs sont lipophiles (Ahel et Giger, 1993 ; Nimrod et Benson, 1996) et peuvent donc s'accumuler dans plusieurs organismes aquatiques tels les algues, les crustacés, les mollusques et les poissons (Ahel, Giger et Koch, 1994 ; Lewis et Lech, 1996 ; Staples *et al.*, 2004).

Dû aux différentes méthodes d'échantillonnage et d'analyse, il est difficile de comparer les concentrations de NP mesurées dans les milieux aquatiques par les différents groupes de scientifiques. Toutefois, dans les 10 dernières années, des concentrations variant entre 0,7 ng/L et 32,9 µg/L ont été mesurées dans l'eau de surface de différentes rivières à travers le monde (Bester, Theobald et Schröder, 2001 ; Petrovic *et al.*, 2002 ; Sabik *et al.*, 2003 ; Wu *et*

al., 2007), avec des variations saisonnières principalement reliées aux températures chaudes estivales (Cailleaud *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2004).

Le NP est un perturbateur endocrinien qui a la capacité de mimer l'hormone naturelle 17 β -estradiol en compétitionnant pour le site de liaison du récepteur d'œstrogène (Ahel et



Figure 3.2. Structure moléculaire du nonylphénol, (Tirée de Sharma *et al.*, 2009).

Giger, 1993 ; Baptista *et al.*, 2009 ; Jobling *et al.*, 1996 ; Lee et Lee, 1996). Son potentiel oestrogénique a été démontré sur plusieurs organismes. Il a été démontré que le NP est capable d'induire la vitellogénèse chez les poissons (Jobling *et al.*, 1996 ; Kinnberg *et al.*, 2000 ; Tabata *et al.*, 2001) et les huîtres (Andrew *et al.*, 2008), il peut induire l'apoptose au niveau des testicules chez le rat (Han *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2003) et altérer la spermatogénèse chez le poisson et le rat (Aravindakshan et Cyr, 2005 ; Aravindakshan *et al.*, 2004a ; Aravindakshan *et al.*, 2004b) en plus d'induire une réponse oestrogénique sur différentes lignées cellulaires humaines (Bechi *et al.*, 2006 ; Shen *et al.*, 2003 ; Van Den Belt *et al.*, 2004). En plus de son pouvoir oestrogénique, le NP diminue la survie de divers zooplanctons tels les copépodes, les rotifères et les cladocères (Servos *et al.*, 2003 ; Severin *et al.*, 2003), induit la sécrétion d'insuline (Adachi *et al.*, 2005) et affecte la croissance de plusieurs espèces d'algues et de cyanobactéries (Graff *et al.*, 2003 ; Hense *et al.*, 2003 ; Hense *et al.*, 2005 ; Wang, Xie et Guo, 2007). Le nonylphénol peut donc affecter plusieurs types d'organismes, ses effets étant variés et effectifs à diverses concentrations. Son rejet dans l'environnement peut ainsi engendrer plusieurs perturbations et la détection et le contrôle de ce contaminant sont donc importants.

Aux États-Unis, l'agence de protection environnementale (EPA) a ainsi établie une concentration maximale de NP ne devant pas être dépassée de 6,6 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau douce et 1,7 $\mu\text{g/L}$ dans l'eau salée (Brooke et Thursby, 2005). Au Canada, les recommandations pour la qualité des eaux établies pour le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés afin de protéger la vie aquatique sont respectivement de 1,0 et 0,7 $\mu\text{g/L}$ pour la vie dulcicole et marine (Environnement Canada, 2002) et le nonylphénol a été ajouté à la liste des substances

toxiques de l'annexe I de la Loi Canadienne sur la protection de l'environnement (Environnement Canada, 2001).

3.3 L'octylphénol

L'octylphénol (OP) résulte également de la biodégradation des APEs et plus précisément de l'OPEO. Les concentrations en OP mesurées durant la dernière décennie sont plus faibles que pour le NP et se situent entre 0,0008 et 1,44 µg/L (Isobe *et al.*, 2001 ; Kuch et Ballschmiter, 2001 ; Loos *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2007) dans l'eau de rivière, avec des concentrations atteignant 3,98 µg/L près des sites de rejet des eaux usées traitées (Céspedes *et al.*, 2008).



Figure 3.3. Structure moléculaire de l'octylphénol, (Tirée de Sharma *et al.*, 2009).

L'OP est considéré comme un perturbateur endocrinien puisqu'il est capable d'agir comme agoniste ou antagoniste du récepteur d'estrogène et ainsi, de moduler les voies endocrines et de mener à des perturbations importantes (Blair *et al.*, 2000 ; Kwack *et al.*, 2002 ; Payne *et al.*, 2000 ; Sonnenschein et Soto, 1998). Il a été démontré que ce xénoestrogène induit la production de vitellogénine (Pedersen *et al.*, 2003 ; Rey Vázquez *et al.*, 2009 ; Segner *et al.*, 2003 ; Toomey, Monteverdi et Di Giulio, 1999), perturbe la morphogénèse des testicules et affecte la reproduction chez le poisson (Aydogan et Barlas, 2006 ; Rey Vázquez *et al.*, 2009). Une exposition continue à l'OP cause une variété de perturbations reproductives chez le poisson telles une diminution du taux de fertilisation et un changement dans le «sex-ratio», en plus de diminuer la croissance et d'augmenter la mortalité chez les nouveau-nés (Knorr et Braunbeck, 2002). L'effet de l'OP a également été mesuré *in vivo* chez les mammifères et il induit une réponse utérine et vaginale chez la rate (Bicknell, Herbison et Sumpter, 1995 ; Katsuda *et al.*, 2000 ; Laws *et al.*, 2000) et affecte la spermatogénèse chez les mâles (Atanassova *et al.*, 2000 ; Khurana, Ranmal et Ben-Jonathan, 2000). Chez les amphibiens et les reptiles, l'OP altère respectivement le développement larvaire et l'expression de protéines dans l'axe hypothalamo-hypophysaire (Crump, Lean et Trudeau, 2002 ; Trudeau *et al.*, 2002).

De plus, la féminisation et des malformations sexuelles chez les escargots ont aussi été démontrés (Oehlmann *et al.*, 2000) et il a été établi que l'OP affecte la croissance de cyanobactéries (Baptista *et al.*, 2009) et de différentes algues (ABC Laboratories Inc., 1984 ; Van Miller et Staples, 2005). Il est donc possible de constater que tout comme le NP, l'OP peut perturber plusieurs organismes et causer diverses réponses. Malgré que l'OP semble avoir un pouvoir oestrogénique plus faible que le NP (Payne *et al.*, 2000), son contrôle et sa détection dans les milieux aquatiques sont importants.

L'octylphénol n'a pas encore été ajouté à la liste des substances toxiques et aucune recommandation pour la qualité des eaux n'a été établie. Cependant, l'évaluation de ses propriétés et les effets toxiques qu'il cause indiquent qu'il sera sans doute ajouté à la liste et qu'il ne constitue en aucun cas un substitut au nonylphénol (Environmental risk management authority, 2007).

3.4 L'estradiol

L'estradiol naturel et synthétique sont des composés estrogéniques qui peuvent être retrouvés dans les écosystèmes aquatiques en concentrations significatives et agir comme perturbateurs endocriniens. L'hormone naturelle, le 17 β -estradiol, est synthétisée par tous les vertébrés femelles et en faible quantité chez les mâles

(Kenneth, 2001 ; Molina, 2004). Le 17 β -estradiol et d'autres estrogènes naturels sont prescrits pour traiter les désordres reliés à la ménopause alors que l'estrogène synthétique, le 17 α -éthynylestradiol, est l'ingrédient actif de la pilule contraceptive. Son potentiel estrogénique est comparable à celui de l'hormone naturelle, le 17 β -estradiol mais contrairement à l'hormone naturelle, l'estrogène synthétique est biodégradé très lentement (Jürgens *et al.*, 2002 ; Ternes, Kreckel et Mueller, 1999). La quantité totale des différents types d'estrogènes excrétées par les humains et les animaux dépend ainsi de l'âge et du sexe

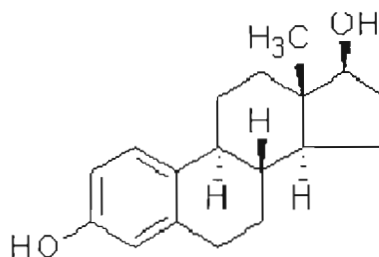


Figure 3.4. Structure moléculaire du β -estradiol, (Tirée de Sigma-Aldrich Co, 2010).

et correspond respectivement à une moyenne de 7, 25, 315 et 1210 $\mu\text{g}/\text{jour}$ chez l'homme, la femme, les bovins et les porcins et peut atteindre 7030 $\mu\text{g}/\text{jour}$ chez la femme enceinte (Jülich, 2000 ; Key *et al.*, 1996 ; Lange *et al.*, 2002).

L'estrogène naturel, ses métabolites (l'estrone et l'estriol) ainsi que l'estrogène synthétique se retrouvent donc dans l'environnement principalement par le rejet des eaux usées traitées. La vitesse de biodégradation étant souvent trop faible, ces substances atteignent les cours d'eau avant d'être complètement dégradés. Des concentrations se situant en moyenne entre 1 et 4 ng/L peuvent être mesurées dans les eaux de surface (Cargouët *et al.*, 2004 ; Hense *et al.*, 2005 ; Ternes *et al.*, 1999). Une étude récente a néanmoins mesuré des taux de 8 ng/L d'estradiol dans l'eau de surface du fleuve St-Laurent alors que cette concentration grimpe à 90 ng/L dans l'eau rejetée par l'usine d'épuration de Montréal (Vigilino *et al.*, 2008b). De plus, les concentrations dans l'environnement pourraient être bien plus grandes puisque l'ethinylestradiol est facilement conjugué et peut ensuite être relâché suite à la déconjugaison (Adler, Steger-Hartmann et Kalbfus, 2001 ; Ternes, Kreckel et Mueller, 1999) et que les estrogènes se lient aisément aux sédiments où ils peuvent être en contact avec les organismes benthiques (Clara *et al.*, 2004 ; De Mes, Zeeman et Lettinga, 2005 ; Peck *et al.*, 2004 ; Strenn, Clara et Kreuzinger, 2003). Malgré des concentrations environnementales dans les nanogrammes, les oestrogènes sont continuellement excrétés et entraînent donc une exposition chronique chez les organismes aquatiques en contact avec ce polluant.

Les effets des composés oestrogéniques retrouvés dans l'environnement sont principalement associés au développement, à la différenciation sexuelle, à la reproduction et à l'induction de la vitellogenèse chez divers organismes tels les poissons (Anderson, Miller et Hinton, 1996 ; Kinnberg *et al.*, 2000 ; Palace *et al.*, 2001 ; Van Den Belt *et al.*, 2004), les mollusques (Andrew *et al.*, 2008 ; Gagné, André et Blaise, 2005) et les huîtres (Andrew *et al.*, 2008). Il a également été démontré qu'une exposition à ces composés peut altérer la distribution de la vitamine A et E chez les poissons (Palace *et al.*, 2001) et induire des dommages à l'ADN chez la larve de bernacle (Atienzar, Billingham et Depledge, 2002). De plus, les composés oestrogéniques peuvent même influencer des organismes qui ne possèdent pas de récepteur à l'estrogène. En effet, les communautés de zoo et de phytoplanctons (diversité, biomasse et

concentration cellulaire) sont influencées par le 17 α -éthynylestradiol (Hense *et al.*, 2008 ; Hense *et al.*, 2004 ; Schramm *et al.*, 2008).

Les faibles concentrations effectives révélées par les différentes études, en plus de la gamme d'organismes susceptibles d'être affectée, démontrent que les composés oestrogéniques ont un potentiel écotoxique important. Pourtant, aucune recommandation canadienne n'a pu être trouvée concernant ces composés.

CHAPITRE IV

ARTICLE: USE OF CHLOROPHYLL *a* FLUORESCENCE TO DETECT THE EFFECT OF MICROCYSTIN ON PHOTOSYNTHESIS AND PHOTOSYSTEM II ENERGY FLUXES OF GREEN ALGAE

Marie-Claude Perron¹, Philippe Juneau¹

¹Department of Biological Sciences-TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms
Laboratory, Université du Québec à Montréal,
Succ. Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada

L'article sera soumis en janvier au journal *Aquatic Toxicology*

4.1 Contribution à l'article

Liste d'auteurs : Marie-Claude Perron, Philippe Juneau

4.2 Abstract

The phenomenon of cyanobacteria bloom, occurs widely in lakes, reservoirs, ponds and slow flowing rivers. Those blooms can have important repercussions, at once on recreational and commercial activities but also on the health of animals and human beings. Indeed, many species are known to produce toxins which are released in water mainly at cellular death. The cyanotoxin most frequently encountered is the microcystin (MC), a hepatotoxin which counts more than 70 variants. The use of fast tests for the detection of this toxin is thus a necessity for the protection of the ecosystems and the human health. A promising method for their detection is a bioassay based on the chlorophyll *a* fluorescence of algae. Many studies have shown that algae are sensible to diverse pollutants, but were almost never used for cyanotoxins. Therefore, our goals were to evaluate the effect of microcystin on the fluorescence of different species of algae and how it can affect the flow of energy through photosystem II. To reach these objectives, we exposed four green algae (*Scenedesmus obliquus* CPCC5, *Chlamydomonas reinhardtii* CC125, *Pseudokirchneriella subcapitata* CPCC37 and *Chlorella vulgaris* CPCC111) to microcystin standards (variants MC-LF, LR, RR, YR) and to microcystin extracted from *Microcystis aeruginosa* (CPCC299), which is known to produce mainly MC-LR. Chlorophyll *a* fluorescence was measured by PEA (Plant Efficiency Analyzer) and LuminoTox. The results of our experiment showed that microcystin affect the photosynthetic efficiency and the flow of energy through photosystem II from 0.01 µg/mL, within only 15 minutes. From exposition to standard of microcystin, we showed that MC-LF was the most potent variant, followed by MC-YR, LR and RR. Moreover, green algae used in this study demonstrated different sensitivity to MCs, *Scenedesmus obliquus* being the more sensitive. We finally demonstrated that LuminoTox was more sensitive to MCs than parameters measured with PEA, although the latter brings indication on the mode of action of MCs at the photosynthetic apparatus level. This is the first report showing a photosynthetic response within 15 minutes of exposition. Our results suggest that bioassay based on chlorophyll fluorescence can be used as a rapid and sensitive tool to detect microcystin.

Keywords: Microcystin; Green algae; Cyanobacteria; Photosynthesis; Energy fluxes

4.3 Introduction

Anthropogenic activities like intensive agriculture and industrialisation are major causes of the eutrophication of lakes and reservoirs. This worldwide phenomenon often leads to the proliferation of cyanobacteria which causes a deterioration of aquatic environments. One serious effects of cyanobacterial bloom formation is the production of toxin. The best known and the most frequently occurring cyanotoxin is named microcystin (MC), a cyclic peptide produced by members of certain genera of cyanobacteria including *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix* and *Microcystis* (Carmichael, 1992 ; Codd *et al.*, 2005 ; Skulberg *et al.*, 1993). Microcystins are hepatotoxic to humans and other mammals as well as for other organisms including fishes, amphibians and invertebrates (Carmichael *et al.*, 2001 ; Dao, Do-Hong et Wiegand, 2010 ; Deblois *et al.*, 2008 ; Drobniewska *et al.*, 2004 ; Dvořáková *et al.*, 2002 ; Ghadouani, Pinel-Alloul et Prepas, 2003 ; Magalhaes *et al.*, 2003). It has also been shown that they can affect growth of photoautotrophic organisms like algae, terrestrial and aquatic plants (Babica *et al.*, 2007 ; MacKintosh *et al.*, 1990 ; Romanowska-Duda *et al.*, 2002 ; Valdor et Aboal, 2007), but what exactly caused the decrease in growth rate is still unknown.

Microcystins are monocyclic heptapeptides which are named according to two variable L-amino acids that can be substituted (Carmichael *et al.*, 1988 ; Sivonen et Jones, 1999 ; Van Apeldoorn *et al.*, 2007). For example, MC-LR contains leucine (L) and arginine (R) while MC-YR contains tyrosine (Y) and arginine (R). Modifications of other parts of the molecule exist as well, and more than 70 structural variants of MC have been described (Codd, Morrison et Metcalf, 2005 ; Spoof *et al.*, 2003). Microcystins also contain an unusual amino acid called Adda for 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyl-deca-4,6-dienoic acid (Harada *et al.*, 2004, Annala, 1996 #495 ; Rinehart *et al.*, 1988). This region is essential for the toxicity of MC because it interacts with the catalytic site of protein phosphatase, inactivating the enzyme by the same way (Barford et Keller, 1994 ; Goldberg *et al.*, 1995). MC are thus strong and specific inhibitor of protein phosphatase types 1 and 2A, abbreviated PP1 and PP2A (MacKintosh *et al.*, 1990 ; Metcalf, Bell et Codd, 2001 ; Yoshizawa *et al.*, 1990).

But cyanobacterial blooms are not always toxic since it can be strictly composed of non toxic strain. It is also possible to find a mix of nontoxic and toxic strains which can produce a wide range of MC variants (Kaebernick et Neilan, 2001 ; Kardinaal et Visser, 2005). Microcystin presence and concentration are thus very hard to evaluate, since distinction between toxic and nontoxic strain cannot be assessed by microscopy. Moreover, analytical methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are costly, require time and handling of sample. It is thus essential to develop additional rapid methods for the detection and the evaluation of microcystins. These methods could help to better monitor cyanobacterial toxins and thus, improve the risk management of health protection.

The aims of this study were to establish the effect of microcystins on phytoplankton photosynthesis and to evaluate if bioassay based on chlorophyll *a* fluorescence of algae could be used to detect microcystins. Thus, we investigated the effect of microcystins on the photosynthesis of several green algae and evaluated how energy fluxes through photosystem II (PSII) were altered. To reach this goal, different photosynthetic organisms were exposed to standard and extract of microcystins and chlorophyll *a* fluorescence was measured by two fluorometers. The sensitivity of the different organisms exposed to microcystin was also discussed.

4.4 Material and methods

4.4.1 Biological Materials

Green algae and cyanobacteria were obtained from the *Canadian Physiological Culture Center* (CPCC) and the *Chlamydomonas Center* (CC). *Chlamydomonas reinhardtii* (CC125), *Pseudokirchneriella subcapitata* (CPCC37), *Scenedesmus obliquus* (CPCC5), *Chlorella vulgaris* (CPCC111), *Microcystis aeruginosa* (CPCC632, non toxic strain) and *Microcystis aeruginosa* (CPCC299, toxic strain) were cultured under a temperature of 25°C in a Bold Basal Medium at pH 6.4 (Stein, 1972). The cultures were grown under a light:dark cycle of 14:10 hours at 50 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, provided by a combination of incandescent bulbs and white fluorescent tubes (Philips F72T8/TL841/HO, USA). Green algae were cultured in 250

mL Erlenmeyer flask and were harvested in their exponential phase while *M. aeruginosa* was cultured in 6 L flask to obtain a large biomass. Cyanobacteria were collected in their exponential phase, filtered, lyophilized and kept at -80°C. SAPS (stabilized photosynthetic aquatic system - thereafter designed *Chlorella vulgaris* (CPCC111)) were obtained from Lab_Bell Inc. (Shawinigan, Quebec, Canada) and kept in the dark at 4°C until use.

4.4.2 Microcystin preparation

Microcystin standards were bought from Alexis Biochemicals and kept at -80°C. As mentioned on the product data sheet, MC-LF, YR and LR were diluted in 100% MeOH and MC-RR was diluted in 80% (v:v) MeOH:H₂O. Microcystin from lyophilized *M. aeruginosa* (CPCC299) cells were extracted following a sequential method according to Deblois et al. (Deblois *et al.*, 2008 ; Deblois et Juneau, 2010). Lyophilized cells were extracted with 1.5 mL of 80% (v:v) MeOH:H₂O (Fastner, Flieger et Neumann, 1998) and sonicated (Fisher Scientific Sonic Dismembrator) at low intensity for 30 s. Samples were then placed on ice and agitated 1h30 with an orbital shaker at 100 RPM. Following the extraction, samples were centrifuged at 14 000 g and supernatant were kept at -20°C in glass vials. The pellet was extracted a second time with the same solvent and a third time with 100% MeOH. The resulting pooled supernatant (4 mL) was kept at -80°C until microcystin determination.

For the evaluation of microcystin concentration, samples were firstly dried under a stream of air and analyzed by immunoassay with an ELISA Microcystin plate kit (Envirologix Inc., Portland, ME, USA) according to the method supplied. Concentrations were confirmed by HPLC-MS/MS (Aubry et al., 2011, in preparation) and based on retention time and UV spectrum (data not shown), HPLC analysis showed that *M. aeruginosa* (CPCC299) produces essentially MC-LR, as previously demonstrated for this strain (Aranda-Rodriguez *et al.*, 2005; Kubwabo, Vais et Benoit, 2005).

4.4.3 Lipopolysaccharides (LPS) preparation: extraction and concentration measurement

Lipopolysaccharides (LPS) were extracted from *M. aeruginosa* (CPCC299 and CPCC632) lyophilised cells using an LPS extraction kit (Intron Biotechnology Inc., Sungnam, Korea) according to manufacturer's protocol. LPS pellets were kept at -20°C until measurement and algal toxicity tests. The chromogenic endpoint *Limulus polyphemus* Amebocyte Lysate (LAL) was used for the determination and the quantification of LPS. Pellets were re-suspended in endotoxin-free water and the endotoxicity of the extracts was determined according to the instructions of the manufacturer (Associates of Cape Cod Inc, MA, USA). All glassware and plasticware used were pyrogen-free and plate absorbance was measured spectrophotometrically at 405 nm with an incubation temperature of 37°C (BioTek PowerWave XS).

4.4.4. Toxicity testing procedure

Green algal cells were harvested in their exponential growth phase and counted with a Multisizer III Counter coulter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) prior to testing. SAPS were activated for 90 minutes at room temperature and light condition. Following this step, the photosynthetic activity efficiency of the SAPS was verified by a test using atrazine and included in the test kit. All biological material was transferred into test tubes for treatment to microcystins at a cell concentration of 500 000 cells/mL. Exposure to microcystins was done during 15 minutes while algae were dark-adapted for complete reoxydation of PSII associated electron carriers. Concentrations used vary from 0.01 to 10 µg/mL and expositions were made at room temperature. In order to have a control for *M. aeruginosa* extract, we exposed algal cells to a non toxic strain of cyanobacteria (*M. aeruginosa* CPCC632). Thus, the same sequential extraction method was done on non toxic cells of *M. aeruginosa* and cell concentrations used for the exposition were equivalent to the number of cells extracted to reach the different microcystin concentrations of 0.01, 0.1 and 1 µg/ml. Finally, an exposition to LPS was done with LPS extracted from the biomass of *M. aeruginosa* needed to obtain 0.01, 0.1 and 1 µg MC/ml. All measurements were done on three replicates.

4.4.5 Measurement of fluorescence

Non-invasive measurements of the photosynthetic activity were conducted using two fluorometers, a PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) and a LuminoTox Analyzer (Lab_Bell Inc., Shawinigan, Quebec, Canada). With the LuminoTox Analyzer, a blue light flash (470 nm) is provided by three light-emitting diodes (LED). Two levels of fluorescence yield, F_1 and F_2 were determined. The first level corresponds to the fluorescence measured under a low-light intensity of $20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ during 2 s. The second level is measured just after the first one and corresponds to the fluorescence yield after a flash of $500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ during 0.7 s. The fluorescence yield of each level is subtracted with the base line fluorescence emission (Bellemare *et al.*, 2006 ; Dewez *et al.*, 2007 ; Lab_Bell, 2007). The photosynthetic efficiency (Φ) is evaluated as:

$$\Phi = (F_2 - F_1) / F_2$$

and allows to calculate a percentage of inhibition from the control as:

$$[(\Phi_{\text{control}} - \Phi_{\text{sample}}) / \Phi_{\text{control}}] \times 100.$$

The PEA induces a fast chlorophyll fluorescence response using high intensity light ($3500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) provided by an array of six LEDs with a peak of emission at 650 nm. Measurements were done using the aqueous-phase attachment of the PEA and kinetics were measured on a time scale of 10 μs to 1 s. Fluorescence induction curves were plotted on a logarithmic time scale and kinetics exhibited a polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence over time, a phenomenon known as the Kautsky effect or O-J-I-P transients (Kautsky et Hirsch, 1931 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). Level O ($F_{50\mu\text{s}}$) corresponds to the minimal Chl *a* fluorescence yield when all photosystem II reaction centers are open, the transient between J ($F_{2\text{ms}}$) and I ($F_{30\text{ms}}$) reflects the gradual reduction of primary electron acceptors, Q_A and Q_B and P level (F_{max}) corresponds to an accumulation of $Q_A^- Q_B^{2-}$ (Lavergne et Leci, 1993 ; Samson, Prášil et Yaakoubd, 1999 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). Kinetics were all normalized by dividing the fluorescence yield at level O to all data.

4.4.6 Data analysis and statistics

Based on the theory of energy fluxes in photosystem II (Force, Critchley et Van Rensen, 2003 ; Strasser, Srivastava et Tsimilli-Michael, 2000 ; Strasser et Strasser, 1995), several fluorescence JIP-test parameters were calculated from the O-J-I-P fluorescence transient following the equations of Strasser and Strasser (1995) presented in table 1.

Data presented in this study were expressed as mean of triplicates \pm standard deviation. Statistical analyses were done with JMP 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and differences among groups were analyzed by ANOVA. Dunnett's tests were done to compare treated groups with control or Tukey-Kramer tests for multiple comparisons. Logarithmic transformations were done on data when necessary and Wilcoxon tests were performed when nonparametric tests were necessary. Data were considered statistically significant when p values ≤ 0.05 . All figures were generated in the software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4.5 Results

4.5.1 Exposition of *Chlorella vulgaris* to standards of microcystin

The effect of microcystins on photosynthesis was investigated by measuring changes in fluorescence yields known to be very sensitive to pollutants and other environmental factors (Barbagallo *et al.*, 2003 ; El Jay *et al.*, 1997 ; Juneau, Qiu et Deblois, 2007 ; Popovic, Dewez et Juneau, 2003 ; Roháček et Barták, 1999). We found that a 15 minutes exposition of *C. vulgaris* to four microcystin standards diminished the photosynthetic efficiency (Φ) measured by the LuminoTox, but at different extent (Fig. 4.1). MC-LR (Fig. 4.1A) was effective from 1 $\mu\text{g/mL}$ and caused a decrease of 14 and 44 % of Φ at 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Low concentrations of MC-RR (Fig. 4.1B) caused non significant ($P \geq 0.05$) decrease of Φ , while 10 $\mu\text{g/mL}$ led to an inhibition of 20%. The strongest inhibition of the photosynthetic efficiency was reached with MC-LF (Fig. 4.1C) which caused a diminution of 30% and 86% at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 1 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Finally, the highest concentration of MC-YR

(1 $\mu\text{g/mL}$ -Fig. 4.1D) was the only effective treatment for this MC variant and caused a diminution of 20%.

JIP-test parameters, expressed as a percentage of the control calculated from the PEA kinetics, indicate how energy fluxes in PSII are distributed between absorption, trapping, electron transport and dissipation (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). Therefore, JIP-test parameters give useful indication on how microcystins affect the distribution of energy in PSII. All microcystin variants tested induced same trend in the modifications of the JIP-test parameters, although the amplitude of the effects was different (Fig. 4.2). The maximum PSII quantum yield, referred also as the trapping probability (F_v/F_m or TR_0/ABS) decreased when MC concentrations increased. MC-LF induced the highest inhibition among the variants studied with a diminution of 9% compared to the control with 1 $\mu\text{g/mL}$, while MC-RR was the least toxic for this parameter with no alteration of the maximum PSII quantum yield at the tested concentrations. The electron transport probability (ET_0/TR_0) and the electron transport rate in an active reaction center (ET_0/RC) were both reduced by the exposition to MC variants. On the other hand, the other three parameters were increased after 15 minutes exposure to MCs. TR_0/RC was not affected significantly by MC variants except for MC-LF, which cause an increase of 5 and 7% with the highest concentrations. The effective dissipation per active reaction centers (DI_0/RC) was increased by MC-LR and LF, in accordance to the observed increase in the effective antenna size of active RCs (ABS/RC).

4.5.2 Exposition of *Chlorella vulgaris* to extracts of microcystins

Photosynthetic efficiency (Φ) of *C. vulgaris* measured with the LuminoTox was affected by the microcystin extract in a concentration dependent manner (Fig. 4.3). Inhibition of Φ was not significant until 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of MC extract and reached an inhibition of 42% at the highest concentration (1 $\mu\text{g/mL}$).

Results obtained with the PEA showed less drastic changes of JIP-test parameters than LuminoTox- Φ (Fig. 4.4). Similarly to the results obtained with microcystin standards, the trapping probability (TR_0/ABS), the electron transport probability (ET_0/TR_0) and the electron

transport rate in an active reaction center (ET_0/RC) were decreased by the exposition to microcystin extract. The strongest inhibition (17%) occurred for ET_0/TR_0 at $1\mu\text{g/mL}$ of MC extract, while the same concentration caused a decrease of 15% and 8% for ET_0/RC and TR_0/ABS respectively. The exposure to the MC extract led to an increase in the effective dissipation per active reaction center (DI_0/RC), the absorbance of light per reaction center (ABS/RC) and the maximal rate of reduction of Q_A (TR_0/RC), but the latter in a non significant way ($P \geq 0.05$). For MC concentrations of $0.25\mu\text{g/mL}$ and higher, the extract caused significant augmentation of ABS/RC and DI_0/RC , and the increase reached 13% and 21% respectively for the highest concentration ($1\mu\text{g/mL}$).

4.5.3 Sensitivity of different green algae to microcystin extract

On top of the experiments done on *Chlorella vulgaris* CPCC111, we investigated the effect of microcystins extracted from *M. aeruginosa* CPCC299 on energy fluxes through PSII of other green algae. The exposition of *S. obliquus* CPCC5, *C. reinhardtii* CC125 and *P. subcapitata* CPCC37 to extracted microcystins during 15 minutes led to significant changes of different JIP-test parameters (Fig. 4.5). For *S. obliquus* (Fig. 4.5A), all parameters were affected at $1\mu\text{g/mL}$ except TR_0/RC , while only TR_0/ABS and DI_0/RC were affected at $0.01\mu\text{g/mL}$. For *P. subcapitata* (Fig. 4.5B), TR_0/ABS was increased significantly only at the highest concentration. ET_0/TR_0 and ET_0/RC were decreased significantly at $1\mu\text{g/mL}$ while DI_0/RC was decreased in a significant way by all concentrations tested. TR_0/RC and ABS/RC were not significantly affected for this alga. Only two parameters were affected for *C. reinhardtii* (Fig. 4.5C), i.e. ET_0/TR_0 and ET_0/RC . The strongest reduction (59%) was observed for ET_0/TR_0 when the alga was treated with $1\mu\text{g/mL}$. ET_0/RC also showed an important reduction (57%) at the highest concentration.

4.5.4 Lipolysaccharides (LPS)

Since we reported a strongest inhibition of the extract of microcystin compared to the equivalent pure toxin and that *M. aeruginosa* CPCC632, a non toxic strain, induced also an inhibition of the photosynthetic efficiency (data not shown), toxicity of lipolysaccharides (LPS) was also evaluated. Thus, we extracted LPS from *M. aeruginosa* CPCC632 and

CPCC299 and the efficiency of the LPS extraction was confirmed by the endotoxin activities (Endotoxin Units, EU) of the samples measured with LAL test (*Limulus polyphemus* Amebocyte Lysate). We measured similar endotoxin activities for both *M. aeruginosa* strains ($1.2 \cdot 10^{-5}$ EU per cell for CPCC632 and $1.14 \cdot 10^{-5}$ EU per cell for CPCC299). All expositions of green algae (*S. obliquus*, *C. reinhardtii*, *P. subcapitata*) to LPS led to no significant effect after 15 minutes, 4 and 24 hours of treatment (data not shown).

4.5.5 Sensitivity of fluorometric methods

To compare the sensitivity of the two fluorometric methods used in this study, we examined the inhibitory response (Ir) related to the PSII photochemical efficiency based on $(F_2 - F_1)/F_2$ for LuminoTox and F_v/F_m for PEA (Fig. 4.6). We noticed that Ir measured by LuminoTox was stronger by a factor of 4 than Ir obtained with the other fluorometer.

4.6 Discussion

4.6.1 Effect of standard of microcystin on *Chlorella vulgaris* photosynthesis

The results of this study demonstrate that microcystin standards affected photosynthesis of *C. vulgaris* when exposed for only 15 minutes. The diminution of the photosynthetic efficiency (Φ) observed by LuminoTox (Fig. 4.1) and supported by the inhibition of the maximum efficiency (F_v/F_m or TR_0/ABS) measured by PEA (Fig. 4.2) indicates that pure microcystins affected PSII photochemistry. Our results are in accordance with previous studies demonstrating that an exposition to microcystin reduced significantly the photochemical efficiency of different photosynthetic organisms (Abe *et al.*, 1996 ; Hu, Liu et Li, 2004 ; Saqrane *et al.*, 2009). However, our exposure time was much shorter than in previous studies (15 min. vs 1-96h), indicating that MCs affect process closely linked to PSII electron transport.

It is well established that an exposition of photosynthetic organisms to microcystin induces the production of ROS (Hu *et al.*, 2005 ; Vardi *et al.*, 2002 ; Yin *et al.*, 2005b) and the enhancement of antioxidant enzymes production (Mohamed, 2008 ; Pflugmacher, 2004 ;

Pflugmacher *et al.*, 2001 ; Pietsch *et al.*, 2001 ; Saqrane *et al.*, 2007 ; Wiegand *et al.*, 2002 ; Yin *et al.*, 2005a ; Yin *et al.*, 2005b). The intracellular increase concentration of ROS, exceeding the detoxication capacity, will lead to the oxidation of biomolecules and induce preferential damage to PSII, with an irreversible oxidation of D1 protein causing its degradation (Drábková, Admiraal et Maršálek, 2007 ; Huang *et al.*, 2010 ; Kim et Lee, 2005 ; Krieger-Liszkay, Fufezan et Trebst, 2008 ; Okada *et al.*, 1996). Therefore, one could ask does the effect of MCs on photosynthesis is due to the alteration of PSII functions.

By analysing energy fluxes within PSII (Fig.4.2), we may obtain a better understanding on how photosynthetic apparatus is altered by MCs. Therefore, we found that an exposition to microcystin reduced electron transport in reaction centers (RCs) since the activity of an active RC (ET_0/RC) and the probability that an electron residing on Q_A^- will enter the transport chain (ET_0/TR_0) were reduced. The increase of ABS/RC is related to the antenna size of PSII and thus can results from an increase in the number of light harvesting complexes (LHC) per reaction center or to an inactivation of RCs (Eullaffroy *et al.*, 2009 ; Force, Critchley et Van Rensen, 2003 ; Krüger, Tsimilli-Michael et Strasser, 1997). However, a modification at the LHC level is unlikely since treatment time was short (15 minutes) and therefore, it appears that the increase in ABS/RC was due to an inactivation of RCs probably by the ROS production in presence of microcystins. This possible inactivation of PSII RCs was confirmed by the increase of total dissipation through active RCs (DI_0/RC) which indicates that energy received in extra has to be dissipated to avoid possible photodamage to remaining active RCs.

We can also notice that there are considerable variations between toxicity of MC variants (Fig.4.1 and 4.2). Indeed, we found significantly higher toxicity of MC-LF for *C. vulgaris*, followed by the variants YR, LR and RR. This is in accordance with previous studies demonstrating that for mice and fishes, MC-RR was significantly less toxic than MC-LR (Atencio *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2006 ; Gupta *et al.*, 2003 ; Ito *et al.*, 2002) and that for mice and human cell lines, MC-YR was more toxic than MC-RR (Gupta *et al.*, 2003 ; Puerto *et al.*, 2009). Also, MC-LF has been shown to be 1.4 to 3.5 times more toxic than MC-LR (Codd *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 2009). The difference of toxicity between variants can be related to their hydrophobicity, which is in part related to the variable L-amino acid present

in the molecule (Lawton *et al.*, 2003). In fact, the octanol/water partition coefficients (log P) of MC-LR and LF have been estimated by HPLC to be 2.16 and 3.56 respectively (Ward et Codd, 1999). MC-LR and RR are more hydrophilic and MC-LF is considerably less polar, thus lipophilic (Codd *et al.*, 1999 ; Lawton *et al.*, 2003 ; McElhiney, Lawton et Leifert, 2001).

4.6.2 Effect of crude extracts of microcystin on photosynthesis

As well as with standards, *C. vulgaris* exposed for only 15 minutes to microcystins extracted from *M. aeruginosa* CPCC299, demonstrated altered photosynthesis. When comparing results obtained with LuminoTox (Fig. 4.1A and 4.3), we can see that the extract, composed essentially of MC-LR, led to a stronger inhibition of the photosynthetic efficiency (Φ) than the pure microcystin-LR. The standard MC-LR at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ caused an inhibition of 2% compared to 11% with the extract and 14% compared to 42% with 1 $\mu\text{g/mL}$ which is 3 times higher. The same observation can be made with measurements obtained by PEA. This is in accordance with previous reports showing that cyanobacterial crude extracts led to stronger effects than pure cyanobacterial toxins used in equivalent concentrations on photoautotroph organisms (Pflugmacher *et al.*, 2006 ; Pietsch *et al.*, 2001 ; Romanowska-Duda et Tarczynska, 2002 ; Sukenik *et al.*, 2002 ; Vardi *et al.*, 2002) and other aquatic organisms like fish (Bury *et al.*, 1996 ; Oberemm, Fastner et Steinberg, 1997). On the other hand, we showed that an exposition of *C. vulgaris* to an extract of *M. aeruginosa* CPCC632, a non toxic strain, led also to a significant inhibition of the photosynthetic efficiency (26%) and that this extract affected significantly energy fluxes of PSII (data not shown). Apart from microcystin, those results suggest that another substance extracted from *M. aeruginosa* affect photosynthesis (see section 4.6.4).

4.6.3 Difference of sensitivity between species

We have demonstrated that energy fluxes through PSII of *S. obliquus*, *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* were affected at different levels by an exposition of 15 minutes (Fig.4.5). For all species tested, the exposition to MC extract did not led any change in TR_0/RC , thus

suggesting that the efficiency in the conversion of excitation energy was maintained (Zhang *et al.*, 2010). The electron transport probability (ET_0/TR_0) was decreased significantly for all algae at the highest concentration which reflects a less efficient electron transfer after Q_A^- to Q_B and to PQ pool and to Cyt b_6/f complex, and may be explained, as discussed above, by the presence of reactive oxygen species induced by MCs. For other parameters, *C. reinhardtii* was affected by MC extract in a similar way than *C. vulgaris* (see section 4.6.2). However, for *S. obliquus* and *P. subcapitata*, three parameters were affected in an unexpected manner. Usually, under stress, TR_0/ABS is decreased while DI_0/RC and ABS/RC are increased but for these species, exposition to MC extract led to the opposite response. This tends to indicate that for these green algae, MC affected photosynthesis differently but further research is needed to explain the different responses of the PSII energy fluxes.

However, contrary to what was shown previously, ABS/RC and DI_0/RC were decreased instead of increased and TR_0/ABS was increased instead of decreased for *S. obliquus* and *P. subcapitata* (Fig.4.5). Indeed, the exposition of those two green algae led to a slight increase of the trapping probability (TR_0/ABS). It indicates that the photosynthetic efficiency of those species was not inhibited by microcystin exposition after an exposition of 15 minutes. However, while the antenna size of PSII is decreased (ABS/RC), less energy is absorbed by the PSII and thus, no energy is received in extra and has to be dissipated, which is in agreement with the diminution of the dissipation flux (DI_0/RC). On the other hand, the trapping flux, absorption and dissipation flux of *C. reinhardtii* were not affected by the conditions of our experiment.

The order of sensitivity to microcystin extract (based on the occurrence of significant effects), from the most sensitive to the least, is *S. obliquus*, *P. subcapitata*, *C. vulgaris* and *C. reinhardtii*. This order of sensitivity established on photosynthesis is in line with what was previously found for growth. Indeed, Babica *et al.* (2007) observed a growth inhibition of *C. reinhardtii* and *P. subcapitata* at 25 and 1 $\mu\text{g/mL}$ respectively of microcystin-LR or RR. It was also shown by measuring the photosynthetic activity and the oxidative stress response, that *P. subcapitata* was more sensitive than *C. vulgaris* when exposed to copper (Knauer *et al.*, 2008). Different responses between species can be related to their morphological and

metabolic properties, as noted previously (Drábková, Admiraal et Maršálek, 2007 ; Juneau *et al.*, 2001 ; van der Grinten *et al.*, 2010 ; Weiner, DeLorenzo et Fulton, 2004). For example, the PSII/PSI ratio, the pigment composition protecting against photo-oxidation (Casper-Lindley et Björkman, 1998 ; Dimier *et al.*, 2009 ; Goss et Jakob, 2010) or the antioxidant abilities (Han *et al.*, 2008 ; Lohrmann, Logan et Johnson, 2004 ; Mohamed, 2008 ; Sabatini *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2005) can be different from one species to another.

4.6.4 Toxicity of Lipopolysaccharides (LPS)

Since we observed that microcystin extract led to stronger effects than the pure equivalent microcystin (MC-LR) and that an extract of a non toxic strain of *M. aeruginosa* (CPCC632) led to an inhibition of the photosynthetic efficiency, we wanted to evaluate if lipopolysaccharides (LPS) may be responsible for this toxicity. LPS are the major component of the outer membrane of all gram-negative bacteria, including cyanobacteria. They are toxic inflammatory agents and irritants of skin and gastro-intestinal tract (Best, Eddy et Codd, 2003 ; Carmichael, 1997 ; Martin *et al.*, 1989 ; Rapala *et al.*, 2002 ; Wiegand et Pflugmacher, 2005). Generally classified as endotoxins, LPS can reach high concentrations during massive cyanobacterial bloom and may lead to health risks (Anderson, Slawson et Mayfield, 2002 ; Rapala *et al.*, 2002 ; Stewart, Schluter et Shaw, 2006). We tested the toxicity of LPS extracted from *M. aeruginosa* CPCC632 and CPCC299 on photosynthesis (data not shown) and we did not observed significant effect on the three studied green algae (*S. obliquus*, *C. reinhardtii*, *P. subcapitata*).

Those results are suggesting that apart from microcystins and LPS, other substances present in *M. aeruginosa* extract may be responsible for the observed inhibition of photosynthesis activity. Some authors showed that cyanobacteria are potential source of other toxic secondary metabolites. *M. aeruginosa* has been found to produce diverse cyanopeptides (Fastner, Erhard et Von Döhren, 2001 ; Welker *et al.*, 2006) such as aeruginosins, kasumigamide, micropeptins or microcins (Harada *et al.*, 2001 ; Ishida et Murakami, 2000 ; Ishida *et al.*, 1999 ; Ploutno, Shoshan et Carmeli, 2002 ; Reshef et Carmeli, 2006 ; Wiegand *et al.*, 2002 ; Yamaki *et al.*, 2005), microviridin (Okino *et al.*, 1995 ; Reshef et Carmeli, 2001

; Rohrlack *et al.*, 2003 ; Rohrlack *et al.*, 2004) and toxic linoleic and linolenic acid (Ikawa, Haney et Sasner, 1996). Several studies have demonstrated that those products have bactericidal activity (Azpiroz et Laviña, 2007 ; Bieler *et al.*, 2006), can inhibit growth and lead to mortality in zooplankton, fish and copepod (Agrawal, Bagchi et Bagchi, 2001, 2005 ; Jungmann et Benndorf, 1994 ; Keil *et al.*, 2002). However, to our knowledge, no studies have demonstrated direct effect of these compounds on photosynthesis and further research is needed to understand if they are responsible of the effect noted in this study.

4.7 Conclusion

We demonstrated in this study that microcystins affect photosynthesis and energy fluxes within photosystem II (PSII). Although there are studies showing that microcystin (MC) affect photoautotroph organisms, the present study is the first to show a photosynthetic response within 15 minutes of treatment. The observed toxicity of pure and extracted microcystins on energy fluxes may indicate an oxidative stress induced by reactive oxygen species. If microcystins are affecting photosynthesis, the central energy production mechanism, it can have an impact on the entire cell. Our results may thus explain studies showing that long term expositions to microcystin affected growth of photoautotroph organisms. Furthermore, we showed that microcystin extracted for *M. aeruginosa* CPCC299 led to stronger effects on energy fluxes than the pure equivalent microcystin (MC-LR) and moreover, that a non toxic strain of cyanobacteria (*M. aeruginosa* CPCC632) caused a significant inhibition of the photosynthetic efficiency. However, it could not be explained by lipopolysaccharide toxicity, thus indicating that another substance present in *M. aeruginosa* extract is responsible for the toxicity observed. More research is therefore needed to point out which compound induced this effect.

We also demonstrated that green algae exposed to microcystins are affected differently. Indeed, *C. reinhardtii* was the most tolerant specie while *S. obliquus* was the most sensitive. This may provide indication on which specie to choose in the elaboration of a sensitive bioassay. Finally, the inhibitory response (Ir) evaluated by LuminoTox ($Ir = (F_2 - F_1)/F_2$) and PEA ($Ir = F_V/F_M$) shown in Fig.4.6 revealed a difference in sensitivity between those

fluorometers. Although we demonstrated that parameters determined with the PEA were less sensitive to MCs compared to Luminotox, this approach permitted to obtain information on the mode of action of MCs at the level of PSII. This study has provided evidence that chlorophyll *a* fluorescence could be use as a fast bioassay to detect cyanotoxins in aquatic environment.

4.8 Acknowledgments

This research was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awarded to P.J.. M-C.P. received a M.Sc. scholarship from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and an international training scholarship from Fonds québécois de recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). The authors thank Sami Haddad and Bénédicte Aubry for HPLC analysis.

4.9 References

- Abe, T., T. Lawson, J. D. B. Weyers et G. Codd. 1996. «Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves : Implications for current spray irrigation practice». *New Phytologist*, vol. 133, no 4, p. 651-658.
- Agrawal, M. K., D. Bagchi et S. N. Bagchi. 2001. «Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India». *Hydrobiologia*, vol. 464, p. 37-44.
- Agrawal, M. K., D. Bagchi et S. N. Bagchi. 2005. «Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806». *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 141, no 1, p. 33-41.
- Anderson, W. B., R. M. Slawson et C. I. Mayfield. 2002. «A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure». *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 48, no 7, p. 567-587.
- Aranda-Rodriguez, R., A. Tillmanns, F. M. Benoit, F. R. Pick, J. Harvie et L. Solenaia. 2005. «Pressurized liquid extraction of toxins from cyanobacterial cells». *Environmental Toxicology*, vol. 20, no 3, p. 390-396.
- Atencio, L., I. Moreno, A. I. Prieto, R. Moyano, A. M. Molina et A. M. Cameán. 2008. «Acute effects of microcystins MC-LR and MC-RR on acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*)». *Toxicologic Pathology*, vol. 36, no 3, p. 449-458.
- Azpiroz, M. F., et M. Laviña. 2007. «Modular structure of microcin H47 and colicin V». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no 7, p. 2412-2419.
- Babica, P., K. Hilscherova, K. Bartova, L. Bláha et B. Maršálek. 2007. «Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs». *Phycologia*, vol. 46, no 2, p. 137-142.
- Barbagallo, R. P., K. Oxborough, K. E. Pallett et N. R. Baker. 2003. «Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging». *Plant Physiology*, vol. 132, no 2, p. 485-493.
- Barford, D., et J. C. Keller. 1994. «Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR». *Journal of Molecular Biology*, vol. 235, no 2, p. 763-766.

- Beauregard, T., et J. Ridal. 2000. «Evaluation of six simple bioassays for the determination of drinking water quality-Canadian results». *Environmental Toxicology*, vol. 15, no 4, p. 304-311.
- Bellemare, F., M. E. Rouette, L. Lorrain, E. Perron et N. Boucher. 2006. «Combined use of photosynthetic enzyme complexes and microalgal photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity». *Environmental Toxicology*, vol. 21, no 5, p. 445-449.
- Best, J. H., F. B. Eddy et G. A. Codd. 2003. «Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum». *Aquatic Toxicology*, vol. 64, no 4, p. 419-426.
- Bieler, S., F. Silva, C. Soto et D. Belin. 2006. «Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease». *Journal of Bacteriology*, vol. 188, no 20, p. 7049-7061.
- Bury, N. R., G. Flik, F. B. Eddy et G. A. Codd. 1996. «The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ -ATPase in tilapia gills». *Journal of Experimental Biology*, vol. 199, no 6, p. 1319-1326.
- Carmichael, W. W. 1992. «Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins». *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 72, no 6, p. 445-459.
- Carmichael, W. W. 1997. «The cyanotoxins». *Advances in Botanical Research*, vol. 27, p. 211-256.
- Carmichael, W. W., S. M. F. O. Azevedo, J. S. An, R. J. R. Molica, E. M. Jochimsen, S. Lau, K. L. Rinehart, G. R. Shaw et G. K. Eaglesham. 2001. «Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins». *Environmental Health Perspectives*, vol. 109, no 7, p. 663-668.
- Carmichael, W. W., V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. I. Harada, T. Krishnamurthy, M. J. Yu, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg et M. Watanabe. 1988. «Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)». *Toxicon*, vol. 26, no 11, p. 971-973.
- Casper-Lindley, C., et O. Björkman. 1998. «Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments». *Photosynthesis Research*, vol. 56, no 3, p. 277-289.
- Chen, Y. M., T. H. Lee, S. J. Lee, H. B. Huang, R. Huang et H. N. Chou. 2006. «Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins». *Toxicon*, vol. 47, no 7, p. 742-746.

- Codd, G. A., S. G. Bell, K. Kaya, C. J. Ward, K. A. Beattie et J. S. Metcalf. 1999. «Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health». *European Journal of Phycology*, vol. 34, no 4, p. 405-415.
- Codd, G. A., L. F. Morrison et J. S. Metcalf. 2005. «Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 203, no 3 SPEC. ISS., p. 264-272.
- Codd, G., J. Lindsay, F. M. Young, L. F. Morrison et J. S. Metcalf. 2005. «Harmful cyanobacteria, from mass mortalities to management measures». In *Harmful Cyanobacteria*, J. Huisman, H.C.P. Matthijs et P. M. Visser, p. 1-23. New York: Springer.
- Dao, T. S., L. C. Do-Hong et C. Wiegand. 2010. «Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring». *Toxicon*, vol. 55, no 7, p. 1244-1254.
- Deblois, C. P., R. Aranda-Rodriguez, A. Giani et D. F. Bird. 2008. «Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs». *Toxicon*, vol. 51, no 3, p. 435-448.
- Deblois, C. P., et P. Juneau. 2010. «Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances». *Harmful Algae*, vol. 9, no 1, p. 18-24.
- Dewez, D., N. Boucher, F. Bellemare et R. Popovic. 2007. «Use of different fluorometric systems in the determination of fluorescence parameters from spinach thylakoid membranes being exposed to atrazine and copper». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 655-664.
- Dimier, C., S. Giovanni, T. Ferdinando et C. Brunet. 2009. «Comparative Ecophysiology of the Xanthophyll Cycle in Six Marine Phytoplanktonic Species ». *Protist*, vol. 160, no 3, p. 397-411.
- Drábková, M., W. Admiraal et B. Maršálek. 2007. «Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms». *Environmental Science and Technology*, vol. 41, no 1, p. 309-314.
- Drobniewska, A., M. Tarczyska, J. Mankiewicz, T. Jurczak et M. Zalewski. 2004. «Increase of crustacean sensitivity to purified hepatotoxic cyanobacterial extracts by manipulation of experimental conditions». *Environmental Toxicology*, vol. 19, no 4, p. 416-420.
- Dvořáková, D., K. Dvořáková, L. Bláha et B. Maršálek. 2002. «Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in *xenopus laevis*: Teratogenesis assay (FETAX)». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 6, p. 547-555.

- El Jay, A., J. M. Ducruet, J. C. Duval et J. P. Pelletier. 1997. «A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: Comparison with effect on cell growth». *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 140, no 2, p. 273-286.
- Eullaffroy, P., C. Frankart, A. Aziz, M. Couderchet et C. Blaise. 2009. «Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides». *Aquatic Botany*, vol. 90, no 2, p. 172-178.
- Fastner, J., M. Erhard et H. Von Döhren. 2001. «Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no 3-12, p. 5069-5076.
- Fastner, J., I. Flieger et U. Neumann. 1998. «Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures». *Water Research*, vol. 32, no 10, p. 3177-3181.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. Van Rensen. 2003. «New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test». *Photosynthesis Research*, vol. 78, no 1, p. 17-33.
- Ghadouani, A., B. Pinel-Alloul et E. E. Prepas. 2003. «Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities». *Freshwater Biology*, vol. 48, no 2, p. 363-381.
- Goldberg, J., H. Huang -b, Y. Kwon -g, P. Greengard, A. C. Nairn et J. Kuriyan. 1995. «Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1». *Nature*, vol. 376, no 6543, p. 745-753.
- Goss, Reimund, et Torsten Jakob. 2010. «Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae». *Photosynthesis Research*, vol. 106, no 1, p. 103-122.
- Gupta, N., S. C. Pant, R. Vijayaraghavan et P. V. L. Rao. 2003. «Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice». *Toxicology*, vol. 188, no 2-3, p. 285-296.
- Han, T., S. H. Kang, J. S. Park, H. K. Lee et M. T. Brown. 2008. «Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure». *Aquatic Toxicology*, vol. 86, no 2, p. 176-184.
- Harada, K. I., S. Imanishi, H. Kato, M. Mizuno, E. Ito et K. Tsuji. 2004. «Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation». *Toxicon*, vol. 44, no 1, p. 107-109.

- Harada, K. I., T. Mayumi, T. Shimada, K. Fujii, F. Kondo, H. D. Park et M. F. Watanabe. 2001. «Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom». *Environmental Toxicology*, vol. 16, no 4, p. 298-305.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu et D. H. Li. 2004. «Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*». *Environmental Toxicology*, vol. 19, no 6, p. 571-577.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu, D. H. Li et A. Dauta. 2005. «Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR». *Hydrobiologia*, vol. 534, no 1-3, p. 23-29.
- Huang, D. Y., M. Mock, B. Hagenbuch, S. Chan, J. Dmitrovic, S. Gabos et D. Kinniburgh. 2009. «Dynamic cytotoxic response to microcystins using microelectronic sensor arrays». *Environmental Science and Technology*, vol. 43, no 20, p. 7803-7809.
- Huang, H. Y., Q. Zhang, L. P. Zhao, J. N. Feng et C. L. Peng. 2010. «Does lutein play a key role in the protection of photosynthetic apparatus in arabidopsis under severe oxidative stress?». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 42, no 4, p. 2765-2774.
- Ikawa, M., J. F. Haney et J. J. Sasner. 1996. «Inhibition of *Chlorella* growth by the lipids of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Hydrobiologia*, vol. 331, no 1-3, p. 167-170.
- Ishida, K., et M. Murakami. 2000. «Kasumigamide, an antialgal peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 65, no 19, p. 5898-5900.
- Ishida, K., Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino et M. Murakami. 1999. «Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 55, no 36, p. 10971-10988.
- Ito, E., A. Takai, F. Kondo, H. Masui, S. Imanishi et K. I. Harada. 2002. «Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds». *Toxicon*, vol. 40, no 7, p. 1017-1025.
- Juneau, P., D. Dewez, S. Matsui, S. G. Kim et R. Popovic. 2001. «Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry». *Chemosphere*, vol. 45, no 4-5, p. 589-598.
- Juneau, P., B. Qiu et C. P. Deblois. 2007. «Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 609-625.

- Jungmann, D., et J. Benndorf. 1994. «Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins». *Freshwater Biology*, vol. 32, no 1, p. 13-20.
- Kaebernick, M., et B. A. Neilan. 2001. «Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 35, no 1, p. 1-9.
- Kardinaal, W. E. A., et P. M. Visser. 2005. «Dynamics of cyanobacterial toxins; Sources of variability in microcystin concentrations». In *Harmful cyanobacteria*, J. Huisman, H. C. P. Matthijs et P. M. Visser, p. 41-57. Netherlands: Springer.
- Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. «Neue versuche zur kohlenensäure assimilation». *Naturwissenschaften*, vol. 19, p. 964.
- Keil, C., A. Forchert, J. Fastner, U. Szewzyk, W. Rotard, I. Chorus et R. Krätke. 2002. «Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains». *Water Research*, vol. 36, no 8, p. 2133-2139.
- Kim, J. H., et C. H. Lee. 2005. «In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves». *Plant Science*, vol. 168, no 4, p. 1115-1125.
- Knauert, S., et K. Knauer. 2008. «The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae». *Journal of Phycology*, vol. 44, no 2, p. 311-319.
- Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan et A. Trebst. 2008. «Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism». *Photosynthesis Research*, vol. 98, no 1-3, p. 551-564.
- Krüger, G. H. J., M. Tsimilli-Michael et R. J. Strasser. 1997. «Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves». *Physiologia Plantarum*, vol. 101, no 2, p. 265-277.
- Kubwabo, C., N. Vais et F. M. Benoit. 2005. «Characterization of microcystins using in-source collision-induced dissociation». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 19, no 5, p. 597-604.
- Lab_Bell, Inc. (2007). LuminoTox: Évaluation rapide d'un indice de contamination chimique. Shawinigan, Québec, Canada: 80 p
- Lavergne, J., et E. Leci. 1993. «Properties of inactive Photosystem II centers». *Photosynthesis Research*, vol. 35, no 3, p. 323-343.
- Lawton, L. A., P. K. J. Robertson, B. J. P. A. Cornish, I. L. Marr et M. Jaspars. 2003. «Processes influencing surface interaction and photocatalytic destruction of microcystins on titanium dioxide photocatalysts». *Journal of Catalysis*, vol. 213, no 1, p. 109-113.

- Lohrmann, N. L., B. A. Logan et A. S. Johnson. 2004. «Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances». *Biological Bulletin*, vol. 207, no 3, p. 225-232.
- MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen et G. A. Codd. 1990. «Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants». *FEBS Letters*, vol. 264, no 2, p. 187-192.
- Magalhaes, V. F., M. M. Marinho, P. Domingos, A. C. Oliveira, S. M Costa, L. O. Azevedo et S. M. F. O. Azevedo. 2003. «Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ)». *Toxicon*, vol. 42, no 3, p. 289-295.
- Martin, C., G. A. Codd, H. W. Siegelman et J. Weckesser. 1989. «Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains». *Archives of Microbiology*, vol. 152, no 1, p. 90-94.
- McElhiney, J., L. A. Lawton et C. Leifert. 2001. «Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure». *Toxicon*, vol. 39, no 9, p. 1411-1420.
- Metcalf, J. S., S. G. Bell et G. A. Codd. 2001. «Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no 2, p. 904-909.
- Mohamed, Z. A. 2008. «Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem». *Ecotoxicology*, vol. 17, no 6, p. 504-516.
- Oberemm, A., J. Fastner et C. E. W. Steinberg. 1997. «Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*)». *Water Research*, vol. 31, no 11, p. 2918-2921.
- Okada, K., M. Ikeuchi, N. Yamamoto, T. A. Ono et M. Miyao. 1996. «Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of Photosystem II by exposure to singlet oxygen: Factors responsible for the susceptibility to cleavage of the proteins». *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1274, no 1-2, p. 73-79.
- Okino, T., H. Matsuda, M. Murakami et K. Yamaguchi. 1995. «New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 51, no 39, p. 10679-10686.

- Pflugmacher, S. 2004. «Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR». *Aquatic Toxicology*, vol. 70, no 3, p. 169-178.
- Pflugmacher, S., V. Amé, C. Wiegand et C. Steinberg. 2001. «Cyanobacterial toxins and endotoxins-Their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms». *Wasser und Boden*, vol. 53, no 4, p. 15-20.
- Pflugmacher, S., K. Jung, L. Lundvall, S. Neumann et A. Peuthert. 2006. «Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, no 9, p. 2381-2387.
- Pietsch, C., C. Wiegand, M. V. Amé, A. Nicklisch, D. Wunderlin et S. Pflugmacher. 2001. «The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors». *Environmental Toxicology*, vol. 16, no 6, p. 535-542.
- Ploutno, A., M. Shoshan et S. Carmeli. 2002. «Three novel protease inhibitors from a natural bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Journal of Natural Products*, vol. 65, no 7, p. 973-978.
- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. «The application of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: Heavy metals, herbicides and air pollutants». In *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, J. R. DeEll et P. M. A. Toivonen, p. 151-184. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Puerto, M., S. Pichardo, A. Jos et A. M. Cameán. 2009. «Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells». *Toxicon*, vol. 54, no 2, p. 161-169.
- Rapala, J., K. Lahti, L. A. Räsänen, A. L. Esala, S. I. Niemelä et K. Sivonen. 2002. «Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment». *Water Research*, vol. 36, no 10, p. 2627-2635.
- Reshef, V., et S. Carmeli. 2001. «Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 57, no 14, p. 2885-2894.
- Reshef, V., et S. Carmeli. 2006. «New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 62, no 31, p. 7361-7369.
- Rinehart, K. L., K. I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem et W. W. Carmichael. 1988. «Nodularin, microcystin, and the configuration of adda». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 110, no 25, p. 8557-8558.

- Roháček, K., et M. Barták. 1999. «Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications». *Photosynthetica*, vol. 37, no 3, p. 339-363.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, P. E. Hansen, W. Zhang, O. Czarnecki, M. Henning, J. Fastner, M. Erhard, B. A. Neilan et M. Kaebernick. 2003. «Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new Microcystis metabolite toxic to Daphnia». *Journal of Chemical Ecology*, vol. 29, no 8, p. 1757-1770.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, M. Kaebernick et B. A. Neilan. 2004. «Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in Daphnia pulex». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no 8, p. 5047-5050.
- Romanowska-Duda, Z., J. Mankiewicz, M. Tarczyska, Z. Walter et M. Zalewski. 2002. «The Effect of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) on Water Plants and Animal Cells». *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 11, no 5, p. 561-566.
- Romanowska-Duda, Z., et M. Tarczyska. 2002. «The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 5, p. 434-440.
- Sabatini, S. E., A. B. Juárez, M. R. Eppis, L. Bianchi, C. M. Luquet et M. C. Ríos de Molina. 2009. «Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no 4, p. 1200-1206.
- Samson, G., O. Prášil et B. Yaakoubd. 1999. «Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence». *Photosynthetica*, vol. 37, no 2, p. 163-182.
- Saqrane, S., I. El ghazali, B. Oudra, L. Bouarab, S. Dekayir, L. Mandi, N. Ouazzani et V. M. Vasconcelos. 2009. «Detection of microcystin contamination by the measurement of the variability of the in vivo chlorophyll fluorescence in aquatic plant *Lemna gibba*». *Toxicon*, vol. 53, no 1, p. 9-14.
- Saqrane, S., I. E. Ghazali, Y. Ouahid, M. E. Hassni, I. E. Hadrami, L. Bouarab, F. F. del Campo, B. Oudra et V. Vasconcelos. 2007. «Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction». *Aquatic Toxicology*, vol. 83, no 4, p. 284-294.
- Sivonen, J., et G. Jones. 1999. «Cyanobacterial toxins». In *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*, I. Chorus et J. Bartram, p. 41-111. London: E & FN Spon.
- Skulberg, O. M., W. W. Carmichael, G. A. Codd et R. Skulberg. 1993. «Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria)». In *Algal toxins in seafood and drinking water*, I. R. Falconer, p. 145-164. London: Academic Press.

- Spoof, L., P. Vesterkvist, T. Lindholm et J. Meriluoto. 2003. «Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography- electrospray ionisation mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, vol. 1020, no 1, p. 105-119.
- Stein, J. 1972. *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press, 448 p.
- Stewart, I., P. J. Schluter et G. R. Shaw. 2006. «Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - A review». *Environmental Health: A Global Access Science Source*, vol. 5, no 7.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. «Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria». *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, no 1, p. 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. «The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples». In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, p. 445-483. London: Taylor & Francis.
- Strasser, R. J., et B.J. Strasser. 1995. «Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test.». In *Photosynthesis from Light to Biosphere*, P. Mathis, p. 977-980. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sukenik, A., R. Eshkol, A. Livne, O. Hadas, M. Rom, D. Tchernov, A. Vardi et A. Kaplan. 2002. «Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism». *Limnology and Oceanography*, vol. 47, no 6, p. 1656-1663.
- Valdor, R., et M. Aboal. 2007. «Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria». *Toxicon*, vol. 49, no 6, p. 769-779.
- Van Apeldoorn, M. E., H. P. Van Egmond, G. J. A. Speijers et G. J. I. Bakker. 2007. «Toxins of cyanobacteria». *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 51, no 1, p. 7-60.
- van der Grinten, E., M. G. Pikkemaat, E. J. van den Brandhof, G. J. Stroomberg et M. H. S. Kraak. 2010. «Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics». *Chemosphere*, vol. 80, no 1, p. 1-6.
- Vardi, A., D. Schatz, K. Beeri, U. Motro, A. Sukenik, A. Levine et A. Kaplan. 2002. «Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake». *Current Biology*, vol. 12, no 20, p. 1767-1772.

- Ward, C. J., et G. A. Codd. 1999. «Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*». *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, no 5, p. 874-882.
- Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo et M. H. Fulton. 2004. «Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species». *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no 2, p. 121-128.
- Welker, M., B. Maršálek, L. Šejnohová et H. von Döhren. 2006. «Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity». *Peptides*, vol. 27, no 9, p. 2090-2103.
- Wiegand, C., A. Peuthert, S. Pflugmacher et S. Carmeli. 2002. «Effects of microcin SF608 and microcystin-LR two cyanobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 4, p. 400-406.
- Wiegand, C., et S. Pflugmacher. 2005. «Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 203, no 3 SPEC. ISS., p. 201-218.
- Yamaki, H., N. Sitachitta, T. Sano et K. Kaya. 2005. «Two new chymotrypsin inhibitors isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-88». *Journal of Natural Products*, vol. 68, no 1, p. 14-18.
- Yin, L., J. Huang, W. Huang, D. Li et Y. Liu. 2005a. «Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR». *Toxicon*, vol. 46, no 8, p. 859-864.
- Yin, L., J. Huang, W. Huang, D. Li, G. Wang et Y. Liu. 2005b. «Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells». *Toxicon*, vol. 46, no 5, p. 507-512.
- Yoshizawa, S., R. Matsushima, M. F. Watanabe, K. Harada, A. Ichihara, W. W. Carmichael et H. Fujiki. 1990. «Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 116, no 6, p. 609-614.
- Yu, J., X. X. Tang, P. Y. Zhang et S. L. Dong. 2005. «Effects of CO₂ enrichment on growth, photosynthesis and activities of antioxidant enzymes of two marine micro-green-algae». *Acta Ecologica Sinica*, vol. 25, no 2, p. 197-202.
- Zhang, T., H. Gong, X. Wen et C. Lu. 2010. «Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*». *Journal of Plant Physiology*, vol. 167, no 12, p. 951-958.

4.10 Figure legend

Figure 4.1 Changes of photosynthetic efficiency measured by LuminoTox and expressed as percentage of control when *Chlorella vulgaris* CPCC111 are exposed during 15 minutes to MC-LR (A), MC-RR (B), MC-LF (C) and MC-YR (D). * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).

Figure 4.2 Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when *Chlorella vulgaris* CPCC111 are exposed during 15 minutes to MC-LR (A), MC-RR (B), MC-LF (C) and MC-YR (D). * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).

Figure 4.3 Changes of photosynthetic efficiency measured by LuminoTox and expressed as percentage of control when *Chlorella vulgaris* CPCC111 are exposed during 15 minutes to microcystin extracted from a culture of *Microcystis aeruginosa* CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).

Figure 4.4 Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when *Chlorella vulgaris* CPCC111 are exposed during 15 minutes to different concentrations of microcystin extracted from a culture of *Microcystis aeruginosa* CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).

Figure 4.5 Changes of JIP test parameters measured by PEA and expressed as percentage of control when *Scenedesmus obliquus* CPCC5 (A), *Pseudokirchneriella subcapitata* CPCC37 (B) and *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 (C) are exposed during 15 minutes to various concentrations of microcystin extracted from a culture of *Microcystis aeruginosa* CPCC299. * indicates a significant difference from the control ($P \leq 0.05$).

Figure 4.6 Comparison of the inhibitory response (Ir) related to the PSII photochemical efficiency. Ir is expressed in percentage of inhibition of F_v/F_m and $(F_2-F_1)/F_2$ for PEA and LuminoTox respectively when *Chlorella vulgaris* CPCC111 are exposed to microcystin extracted from a culture of *Microcystis aeruginosa* CPCC299.

4.11 Figures

Figure 4.1

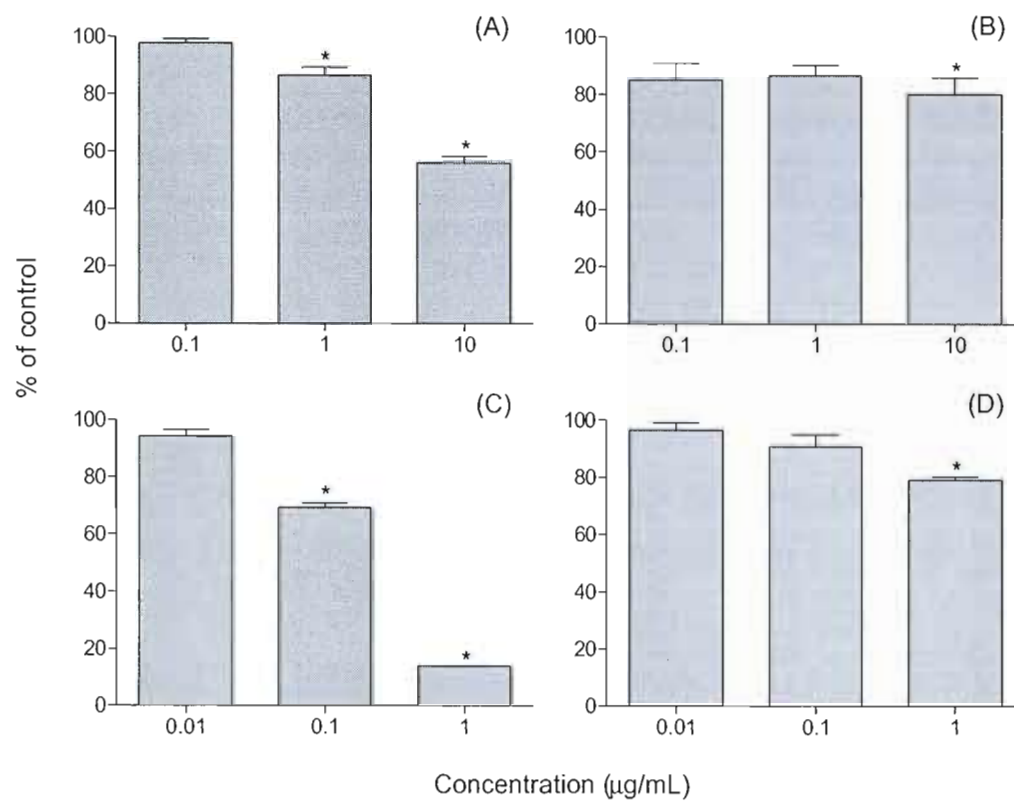


Figure 4.2

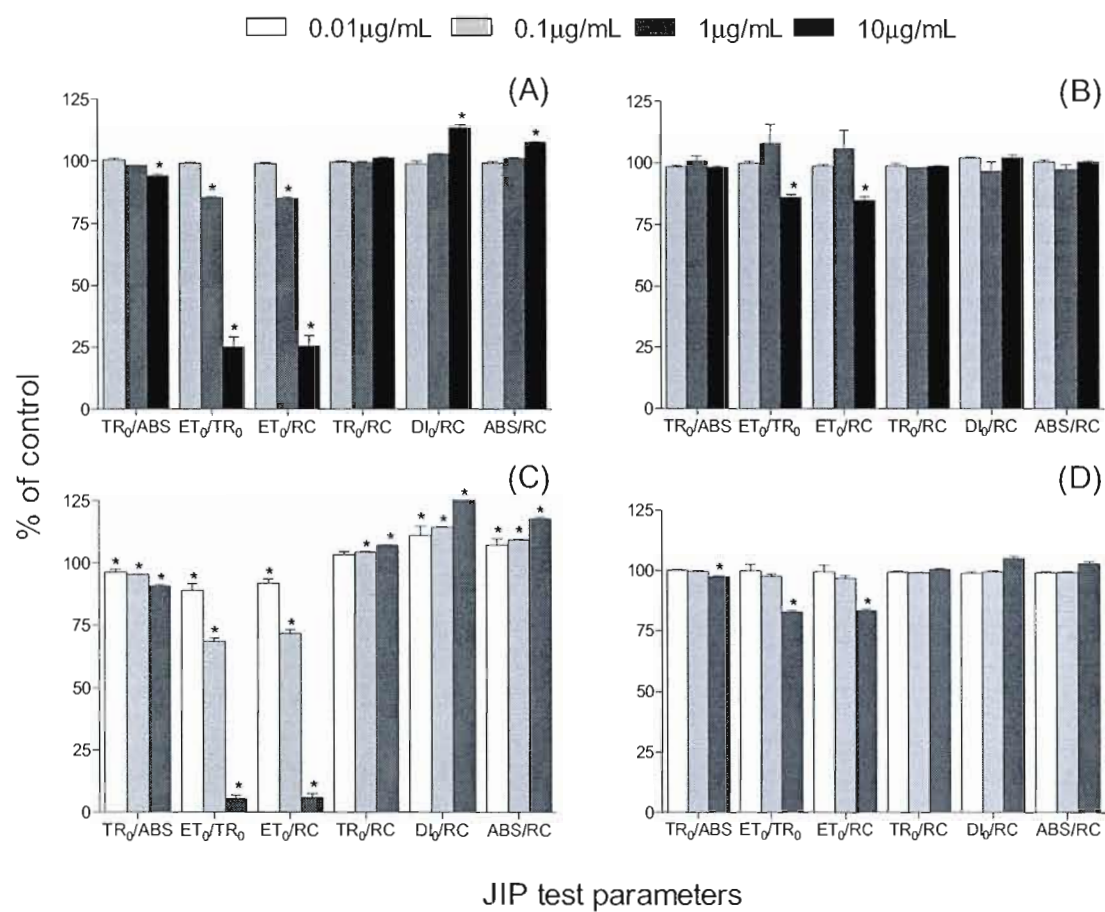


Figure 4.3

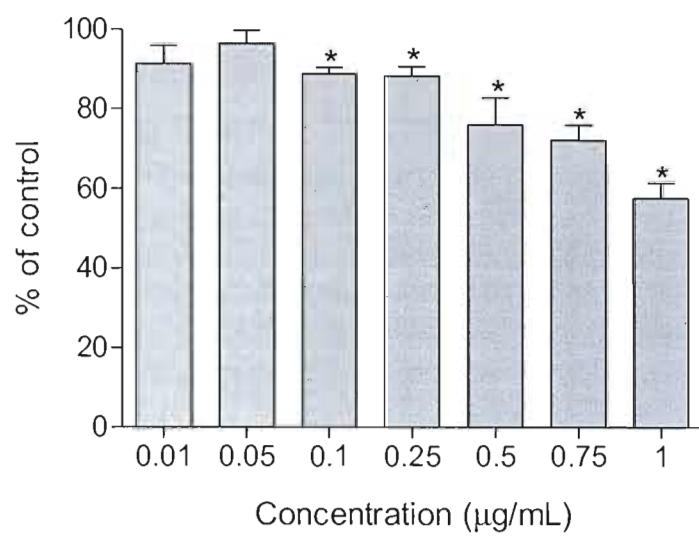


Figure 4.4

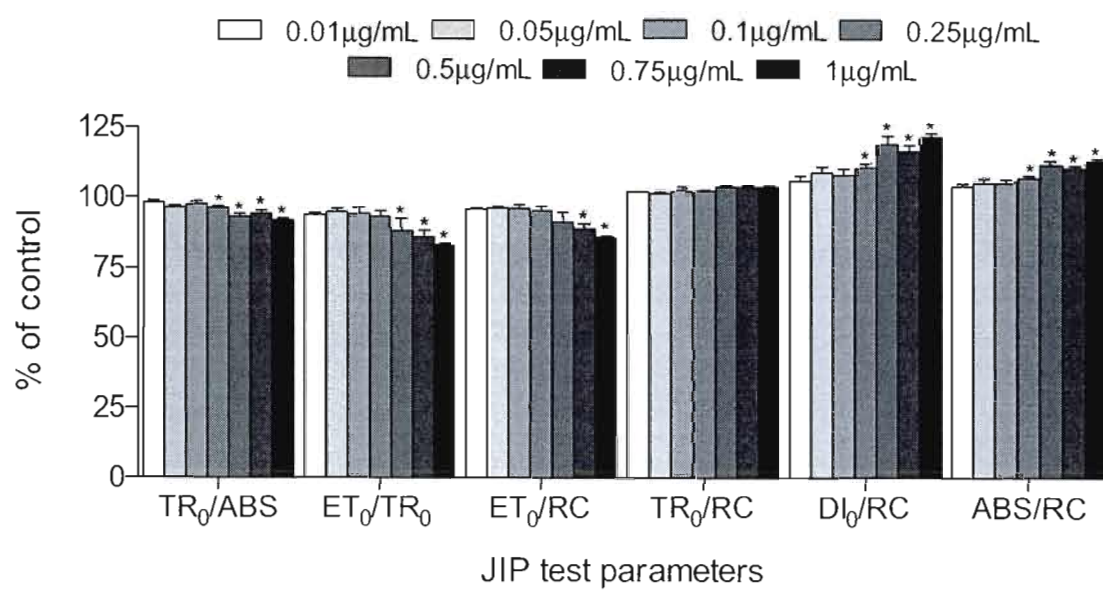


Figure 4.5

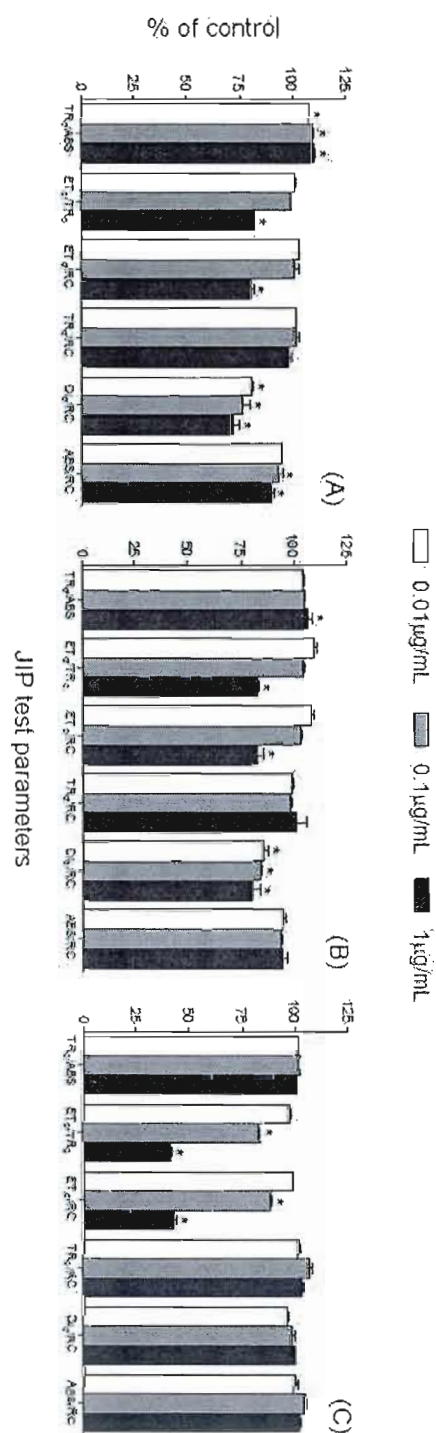
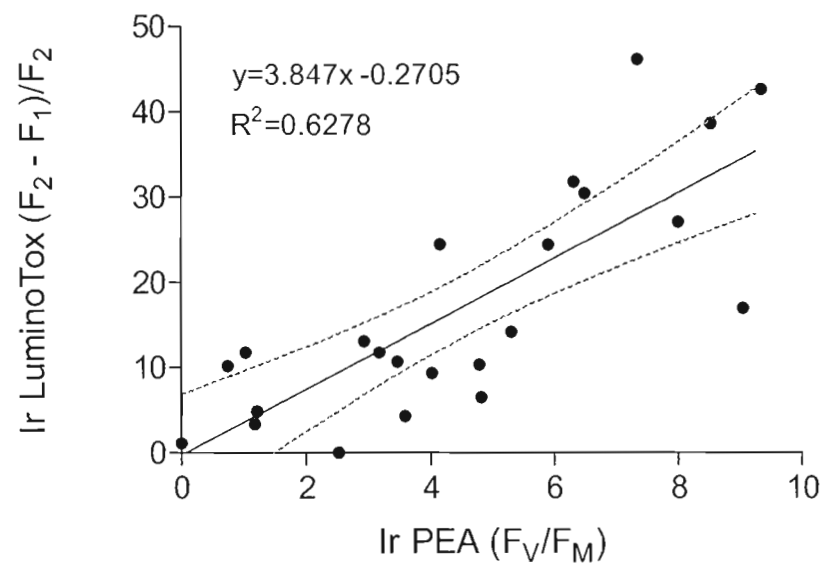


Figure 4.6



4.12 Table

Table 4.1 Listing of JIP-test parameters with the biological meaning and formulae calculated from the O-J-I-P fluorescence transient following the equations of Strasser and Strasser, 1995.

Parameters	Formulae	Biological meaning
M_0	$4 \cdot (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$	The net rate of PSII closure
TR_0/ABS or F_V/F_M	$(F_M - F_{50\mu s}) / F_M$	The trapping probability or the maximum efficiency of PSII photochemistry
ABS/RC	$(TR_0/RC) / (TR_0/ABS)$	The effective antenna size of an active RC
ET_0/RC	$(TR_0/RC) \cdot (ET_0/TR_0)$	The electron transport rate in an active RC
ET_0/TR_0	$(1 - V_J)$ where $V_J = (F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$	The electron transport probability
TR_0/RC	(M_0/V_J)	The maximal trapping rate of PSII
DI_0/RC	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$	The effective dissipation of an active RC

CHAPITRE V

ARTICLE: EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTERS ON PHOTOSYSTEM II ENERGY FLUXES OF GREEN ALGAE AND CYANOBACTERIA

Marie-Claude Perron¹, Philippe Juneau¹

¹Department of Biological Sciences-TOXEN, Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms
Laboratory, Université du Québec à Montréal,
Succ. Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada

Article publié dans

Environmental Research 111 (2011); 520-529

5.1 Contribution à l'article

Liste d'auteurs : Maric-Claude Perron, Philippe Juneau

5.2 Abstract

Among the numerous toxics found in the aquatic environment, endocrine disrupters can interfere with the normal functioning of the endocrine system of several organisms, leading to important consequences. Even if algae and cyanobacteria are non-target organisms without endocrine system, our goals were to verify if endocrine disrupters can affect photosynthetic activity and how energy flows through photosystem II (PSII) were altered. To reach these objectives, we exposed, for 15 minutes, two green algae (*Chlamydomonas reinhardtii* strain CC125, *Pseudokirchneriella subcapitata* strain CPCC37) and a toxic and a non toxic strain of *Microcystis aeruginosa* (CPCC299 and CPCC632 respectively) to 4-Octylphenol, 4-Nonylphenol and β -Estradiol at concentrations ranging from 0.1 to 5 μ mL. We have shown for the first time that endocrine disrupters may have drastic effects on PSII energy fluxes. Furthermore, we showed that various species have different sensitivity to endocrine disrupters. *P. subcapitata* was tolerant to each endocrine disrupter tested, while flows of energy through PSII were affected similarly, but at different extent, for the other species. Cyanobacterial PSII energy fluxes were more affected than green algae, suggesting that the prokaryotic characteristics of these organisms are responsible of their high sensitivity.

Keywords: Nonylphenol; Octylphenol; Estradiol; Green algae; Cyanobacteria; Photosynthesis; Energy fluxes

5.3 Introduction

Endocrine disrupters (EDs) are exogenous substances that cause adverse effects by altering endocrine functions (European, 1997). Even a subtle alteration of these functions can lead to changes in growth, development, reproduction or behaviour of the affected organism or on the next generation. ED's modes of action are complex; they can act as agonist or antagonist of endogenous hormones, or affect their synthesis or metabolism (Isidori *et al.*, 2006 ; Soares *et al.*, 2008 ; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006).

Nonylphenol and octylphenol result from the degradation of alkylphenol polyethoxylates (APEs) (Koh, Lester et Scrimshaw, 2005 ; Shao, Hu et Yang, 2003 ; Soares *et al.*, 2008). APEs are non-ionic surfactants used in industrial and domestic cleaning products, paints, herbicides, pesticides and for paper and textile production (Isidori *et al.*, 2006 ; Nimrod et Benson, 1996 ; Wang et Xie, 2007). They are persistent and lipophilic and can bind to estrogen receptors and act as agonist of the natural hormone (Ahel et Giger, 1993 ; Baptista *et al.*, 2009 ; Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Lee et Lee, 1996 ; Nimrod et Benson, 1996). Because APEs are not expensive and very effective, they are widely used and consequently, they can be found in lakes, rivers and groundwaters (Ahel, Giger et Koch, 1994 ; Bennie, 1999 ; Cailleaud *et al.*, 2007 ; Soares *et al.*, 2008).

Nonylphenol (NP) is one of the most studied estrogen agonist and is known to interact with several organisms including phytoplankton, invertebrate, fish and mammal (Correa-Reyes *et al.*, 2007 ; Lussier *et al.*, 2000 ; Servos *et al.*, 2001 ; Soares *et al.*, 2008 ; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006 ; Wang, Xie et Guo, 2007). This ED can be found in natural surface waters at concentration as high as 325µg/L (Ahel, Giger et Koch, 1994 ; Bennie, 1999 ; Gross-Sorokin *et al.*, 2003 ; Wang et Xie, 2007) and the maximum concentration detected in effluent derived from a shipyard oil/water separator is 6300µg/L (Hale *et al.*, 2000). Octylphenol (OP) is considered to be a xenoestrogen as it induces vitellogenin production (Pedersen *et al.*, 2003 ; Rey Vázquez *et al.*, 2009 ; Toomey, Monteverdi et Di Giulio, 1999) and affects reproduction, survival and sex ratio of fish (Knorr et Braunbeck, 2002 ; Segner *et al.*, 2003). The concentrations of octylphenol detected in water range from 1 to 3.98 µg/L (Bennie *et al.*,

1997 ; Céspedes *et al.*, 2008 ; Isobe *et al.*, 2001 ; Loos *et al.*, 2009). Natural and synthetic estradiols (E) are other significant estrogenic compounds present in aquatic ecosystems that act as endocrine disrupter. Estradiols enter in the aquatic environment mainly through sewage treatment effluents and concentrations ranging from 1 to 4 ng/L can be found in lakes and rivers (Belfroid *et al.*, 1999 ; Cargouët *et al.*, 2004 ; Hense *et al.*, 2005 ; Ternes *et al.*, 1999). The detection and occurrence of estradiol in aquatic environment is associated to vitellogenesis and reproductive abnormalities in fish and mollusc (Anderson, Miller et Hinton, 1996 ; Andrew *et al.*, 2008 ; Blaise *et al.*, 2003 ; Gagné, André et Blaise, 2005 ; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006).

Although EDs toxicity has been extensively studied in higher trophic level organisms, few information exist on their effects on the first aquatic food web organisms. It was shown that the growth of *Microcystis aeruginosa*, a cyanobacteria, was enhanced by low NP concentrations (Wang et Xie, 2007 ; Wang, Xie et Guo, 2007). No effect of NP on photosynthetic oxygen evolution was observed in the marine alga, *Isochrysis galbana*, at concentrations lower than 100 µg/L, while photosynthesis was completely inhibited at 1 mg/L NP after 1 hour treatment (Correa-Reyes *et al.*, 2007). OP, at concentrations higher than 0.062 mg/L, was shown to decrease by 50% the growth of *M. aeruginosa*, *Pseudokirchneriella subcapitata* (formerly named *Selenastrum capricornutum*) and *Scenedesmus subspicatus* (Baptista *et al.*, 2009 ; Commission, 2005). E effective concentration inhibiting 50% of the photosynthetic activity of the green alga *Desmodesmus subspicatus* when exposed for 24h was 12.4 mg/L (Escher *et al.*, 2005b).

Photosynthetic processes support the biochemical reactions needed for plant development (Owens, 1996), and are very sensitive to various pollutants affecting directly or not the electron transport chain (Juneau, Qiu et Deblois, 2007 ; Schreiber *et al.*, 2007). Also, it has been shown that photosynthetic activity can be modulated by xenobiotics, such as the insecticide dimethoate, affecting processes having no apparent direct or indirect link with photosynthesis (Chen, Juneau et Qiu, 2007 ; Mohapatra *et al.*, 2010).

Although some studies have shown that EDs may affect algal and cyanobacterial growth, the mode of action of EDs on phytoplankton is, to our knowledge, still unknown. Therefore, the aim of this study was to investigate how photosynthetic activity and energy fluxes within photosystem II of organisms lacking endocrine system may be affected by 4-Nonylphenol, 4-Octylphenol and β -Estradiol. We also wanted to study the difference in sensitivity of two green algae and two cyanobacteria to these endocrine disrupters.

5.4 Material and methods

5.4.1 Cell culture and sample preparation

Algae were obtained from the *Canadian Physiological Culture Center* (CPCC) and the *Chlamydomonas Center* (CC). *Chlamydomonas reinhardtii* (CC125), *Pseudokirchneriella subcapitata* (CPCC37) and a toxic and a non toxic strain of *Microcystis aeruginosa* (CPCC299 and CPCC632 respectively) were cultured at 25°C in a Bold Basal Medium at pH 6.4 (Stein, 1972). Cultures were grown under a combination of incandescent bulbs and white fluorescent tubes (Philips F72T8/TL841/HO, USA) at $50 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, with a light:dark cycle of 14:10 hours. Cells were harvested in their exponential phase and counted with a Multisizer III Counter coulter (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). Then, they were transferred in test tubes for treatment to endocrine disrupters (cell concentration of 500 000 cells/mL).

5.4.2 Preparation of endocrine disrupters and exposition

Endocrine disrupters (EDs) were bought from Sigma-Aldrich Co. and dissolved in water and dimethyl sulfoxide (DMSO). The concentration of DMSO used for treatments never exceeds 0.5% and this concentration did not induce any effect on photosynthetic activity and photosystem II energy fluxes (data not shown and (El Jay, 1996 ; Wang, Xie et Guo, 2007). Six ED concentrations (0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5 $\mu\text{g/mL}$ for 4-Octylphenol and 4-Nonylphenol and 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 4 $\mu\text{g/mL}$ for β -Estradiol), were used to expose phytoplankton in triplicate for 15 minutes. Samples were dark-adapted 15 minutes for complete reoxydation of PSII associated electron carriers.

5.4.3 Measurement of fluorescence transient

Fluorescence transients were recorded using a PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) at room temperature. Measurements were performed on 2mL of samples in 6-mm diameters vials, using the aqueous-phase attachment of the PEA. Illumination was provided by an array of six light-emitted diodes with a peak of emission at 650nm, and an actinic light of 3500 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fast fluorescence kinetics were measured on a time scale of 10 μs to 1s. The fluorescence yield at 50 μs was considered as the initial fluorescence (F_0) and the maximal fluorescence yield as F_M . Fluorescence kinetics showed a polyphasic rise over time known as the O-J-I-P transients (Kautsky et Hirsch, 1931 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). The initial fluorescence level, O, corresponds to the minimal Chl *a* fluorescence yield with all photosystem II reaction centers open while the J-I transient is caused by the gradual reduction of primary electron acceptors, Q_A and Q_B . Finally, P level is the maximal fluorescence yield (F_M) when there is an accumulation of Q_A^- Q_B^{2-} (Lavergne et Leci, 1993 ; Samson, Prášil et Yaakoubd, 1999 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995). To visualize O-J-I-P transitions, fluorescence induction curves were plotted on a logarithmic time scale. Moreover, curves were plotted as the relative variable fluorescence, $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$, to better visualize changes in the shape of the transients (Eullaffroy *et al.*, 2009 ; Strasser, Srivastava et Govindjee, 1995).

5.4.4 Data analysis and statistics

Based on the theory of energy fluxes in photosystem II (Strasser, Srivastava et Tsimilli-Michael, 2000 ; Strasser et Strasser, 1995), ABS corresponds to photons absorbed by the antenna pigments and most of this excitation is transferred to the reaction centers (RC) as a trapping flux (TR). There, the energy is converted by the reduction of Q_A to Q_A^- which is then reoxidised to Q_A and creates an electron transport flux (ET). Finally, a part of the energy is dissipated as heat, fluorescence or transferred to other systems and is described by DI. J-I-P test parameters are used to explain the energy fluxes through PSII (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). According to Strasser and Strasser (1995), the following equations were used to evaluate energy fluxes in PSII:

- The net rate of PSII closure, $M_0 = 4 \cdot (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$
- The trapping probability or the maximum efficiency of PSII photochemistry, TR_0/ABS or $F_v/F_M = (F_M - F_{50\mu s}) / F_M$
- The effective antenna size of an active RC, $ABS/RC = (TR_0/RC) / (TR_0/ABS)$
- The electron transport rate in an active RC, $ET_0/RC = (TR_0/RC) \cdot (ET_0/TR_0)$
- The electron transport probability, $ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$ where $V_J = (F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$
- The maximal trapping rate of PSII, $TR_0/RC = (M_0/V_J)$
- The effective dissipation of an active RC, $DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$

Data presented were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analyses were done with JMP 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and statistical differences between controls and samples exposed to endocrine disruptors were analyzed by ANOVA, Tukey-Kramer multiple comparisons and Wilcoxon test when nonparametric tests were necessary (p values < 0.05 were considered significant). All figures were generated in the software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

5.5 Results and discussion

5.5.1 Effect of 4-nonylphenol (4-NP) on photosystem II energy fluxes

Figure 5.1 shows the rapid rise fluorescence kinetics of the different studied species exposed for 15 minutes to 4-Nonylphenol (4-NP) at a concentration of $5\mu g/mL$. As seen, *P. subcapitata* and *M. aeruginosa* (strain CPCC299) were not affected by 4-NP and their fluorescence kinetics represent typical sigmoid shaped fluorescence induction curves obtained for dark adapted algae with the different characteristic transient steps (O-J-I-P) (Figure 5.1 A and D). On the other hand, we can observe a significant decrease in the fluorescence yield for the other studied species (Figure 5.1 B-C). When fluorescence kinetics are normalized to their variable fluorescence, we can emphasize the changes occurring in the different transients (Figure 5.1 - inserts). Treatment to 4-NP caused a drastic increase at J transient for *M. aeruginosa* (strain CPCC632) and *C. reinhardtii* (inserts Figure 5.1 B-C), which indicates that 4-NP appears to block electron transfer from Q_A^- to Q_B resulting in an accumulation of Q_A^- . This observed effect of 4-NP is very similar to the one observed when

algae are treated with diuron, a well characterized electron transfer blocker compound (Eullaffroy *et al.*, 2009).

Analysis of the O-J-I-P fluorescence kinetic allows calculation of various parameters indicating how photosystem II (PSII) energy fluxes are distributed, between absorption, trapping, electron transport and dissipation (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). The maximal efficiency of PSII photochemistry or the trapping probability (F_v/F_m or TR_0/ABS) is often used to evaluate the toxic effect of xenobiotics on algae (Chalifour *et al.*, 2009 ; Juneau, Qiu et Deblois, 2007 ; Ralph *et al.*, 2007). In accordance with the effect of 4-NP observed on the fluorescence kinetics, TR_0/ABS or F_v/F_m declined in response to this endocrine disrupter, except for *P. subcapitata* and *M. aeruginosa* (strain CPCC299) where no change was observed (Figure 5.2). It appears that 4-NP affected directly PSII photochemistry since the variable fluorescence yield and F_v/F_m were decreased in a concentration dependent manner after only 15 minutes exposure to 4-NP (data not shown). This decrease in the maximum efficiency of PSII is in agreement with previous results showing a decline of oxygen evolution of the marine prymnesiophyte, *Isochrysis galbana*, when exposed for one hour to nonylphenol at concentrations higher than 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Correa-Reyes *et al.*, 2007).

The decrease of TR_0/ABS of phytoplankton exposed to 4-NP is associated with a significant increase (49% and 63%) in the antenna size of PSII (ABS/RC) for *M. aeruginosa* strain CPCC632 and *C. reinhardtii* respectively (Figure 5.2 B-C). The increase of ABS/RC may be due to an increase in the number of light harvesting complexes per PSII reaction center or to an inactivation of the reaction centers (Eullaffroy *et al.*, 2009 ; Force, Critchley et Van Rensen, 2003 ; Krüger, Tsimilli-Michael et Strasser, 1997). However, due to the treatment conditions (15 minutes in the dark), the modification at the light harvesting complex level is unlikely.

For the two sensitive species, the activity of active reaction centers (ET_0/RC) was decreased by up to 48%, indicating that the re-oxydation of reduced Q_A through electron transport is compromised by the presence of 4-NP. It is resulting in a decrease (up to 52%) of the

probability that an electron residing on Q_A will enter the electron transport chain (ET_0/TR_0), thus confirming that 4-NP blocked electron flow at the Q_B binding site (Figure 5.1) similarly to triazine herbicides (Trebst, 2007). The maximal rate by which an exciton is trapped by active reaction centers (TR_0/RC) was slightly increased, indicating that there was an increased reduction of Q_A to Q_A^- . This is also confirmed by the approximation of the slope at the origin of fluorescence rise (M_0), which is attributed to the rate of Q_A reduction rate (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). Indeed, we noticed an increase of Q_A reduction rate by 48% and 59% for *M. aeruginosa* strain CPCC632 and *C. reinhardtii* respectively. In order to avoid possible photodamage due to the electron transport blockage between Q_A and Q_B by 4-NP, light energy has to be dissipated through other mechanisms (Strasser, Srivastava et Tsimilli-Michael, 2000). We noticed that the effective dissipation of active reaction centers (DI_0/RC) increased by 85% and 111% respectively for *M. aeruginosa* strain CPCC632 and *C. reinhardtii*. This dissipation process is influenced by the ratio of active/inactive reaction centers and reflects the absorption of photons in excess of what can be trapped by the reaction centers (Force, Critchley et Van Rensen, 2003). Therefore, since we demonstrated that 4-NP affected other energy fluxes in PSII reaction centers, this increase in the dissipation of energy compensates for the ineffective use of energy by other pathways and agrees with the decrease of maximum efficiency of PSII (F_v/F_m). The observed concomitant increase in the effective dissipation (DI_0/RC) and decrease in the electron transport probability (ET_0/TR_0) may, however, indicate photoinhibitory conditions.

5.5.2 Effect of 4-octylphenol (4-OP) on photosystem II energy fluxes

As for the 4-NP treatment, 4-OP affected drastically the PSII primary photochemistry as seen by the strong decrease in the fluorescence yield of the studied species, except for *P. subcapitata* (Figure 5.3). For *M. aeruginosa* strain CPCC632 and *C. reinhardtii* treated with 4-OP, it can be noticed that the characteristic sigmoidal shape of the fluorescence kinetic disappeared completely and that the fluorescence yield at J transient increased drastically (inserts Figure 5.3 B-C). These modifications indicate a strong effect of this endocrine disrupter on the PSII primary photochemical events. *M. aeruginosa* strain CPCC299 depicted an increase in the J transient when exposed to 4-OP (insert Figure 5.3 D) indicating that

electron transport appeared to be blocked between Q_A and Q_B . However, the effect was less drastic than for *M. aeruginosa* strain CPCC632 and *C. reinhardtii*, indicating that this strain of *M. aeruginosa* may have some protective mechanisms.

Figure 5.4 shows that PSII energy fluxes of all phytoplankton studied, except for *P. subcapitata*, are greatly affected by 4-OP. Indeed, TR_0/ABS or F_v/F_m decreased by up to 79% for *M. aeruginosa* (CPCC632). The absorption flux per reaction center (ABS/RC), which indicates the PSII antennae size, was increased by up to 415% of the control in *M. aeruginosa* (CPCC632) and may indicate an inactivation of PSII reaction centers by 4-OP. Concomitantly to this inactivation of PSII reaction centers, ET_0/RC was decreased by 90%, 72% and 30% respectively for *C. reinhardtii*, *M. aeruginosa* (CPCC632) and *M. aeruginosa* (CPCC299). The probability that an electron residing on Q_A enters in the electron transport chain (ET_0/TR_0) was also reduced drastically by 4-OP (up to 90% for *C. reinhardtii*). This is consistent with the result showing that the electron transport was blocked between Q_A and Q_B (increase in the fluorescence yield at J transient, Figure 5.3). It appears that 4-OP did not affect TR_0/RC . On the other hand, 4-OP increased the rate of Q_A reduction as seen by the strong increase in M_0 values for all species, except for *P. subcapitata*. Because of the described effects on the PSII primary photochemistry (electron transport blocked between Q_A and Q_B), DI_0/RC was drastically increased, by up to 831% for *M. aeruginosa* CPCC632. It was previously found that 4-OP inhibited growth of cyanobacteria, but no evidence was found concerning the cellular mode of action of 4-OP (Baptista *et al.*, 2009). Our results demonstrated that one of the possible causes of the observed growth inhibition is related to the alteration of photosynthesis, specifically at the PSII level.

5.5.3 Effect of β -Estradiol (β -E) on photosystem II energy fluxes

β -Estradiol decreased the fluorescence yield of the two strains of *M. aeruginosa* but did not affect significantly the fluorescence yields of the two green algae (Figure 5.5). When the fluorescence kinetics were plotted as the relative variable fluorescence to better reveal the changes in the transients (inserts Figure 5.5), we noticed that the β -E increased slightly fluorescence yield at J transient for all species except for *P. subcapitata*.

The maximum efficiency of PSII was slightly affected for the two *M. aeruginosa* strains and *C. reinhardtii* (Figure 5.6). The absorption fluxes per reaction center (ABS/RC) were increased by 21% and 33% respectively for *M. aeruginosa* (CPCC632) and *M. aeruginosa* (CPCC299) while for *C. reinhardtii*, it was not significantly affected. The probability that an electron residing on Q_A will enter the electron transport chain (ET_0/TR_0) was decreased slightly for the two *M. aeruginosa* strains. For these species, the rate of Q_A reduction, evaluated by the M_0 parameter, increased by up to 20%. As it was observed for the other EDs, DI_0/RC was increased, but at a less extent (19%, 37% and 56%, respectively for *C. reinhardtii*, *M. aeruginosa* (CPCC632) and *M. aeruginosa* (CPCC299). Therefore, β -E seems to have only small effect on the PSII energy fluxes compared to the effects observed for the other two endocrine disrupters studied. This might be explained by the low lipophylicity factor of β -E compared to the other studied EDs (Ahel et Giger, 1993 ; Escher *et al.*, 2005a).

5.5.4 Species sensitivity to endocrine disrupters

Table 5.1 represents concentrations of each ED inducing at least 10% effect on the different PSII energy fluxes and was used to establish an order of sensitivity. The ranking of the species was established from the most sensitive to the least sensitive: For 4-Nonylphenol: *M. aeruginosa* (CPCC632) > *C. reinhardtii* > *M. aeruginosa* (CPCC299) > *P. subcapitata*. For 4-Octylphenol: *M. aeruginosa* (CPCC632) > *M. aeruginosa* (CPCC299) > *C. reinhardtii* > *P. subcapitata*. And for β -Estradiol: *M. aeruginosa* (CPCC632) > *M. aeruginosa* (CPCC299) > *C. reinhardtii* > *P. subcapitata*.

As seen, the effect of EDs on these energy fluxes varied greatly between species and between EDs. *P. subcapitata* was not influenced by any of the EDs tested at concentration as high as their solubility limits. This may indicate that for this green algal specie, the different EDs do not penetrate into the cell as it was demonstrated previously for estradiol (Della Greca *et al.*, 2008). On the other hand, the other green alga studied in our experiment, *C. reinhardtii*, demonstrated sensitivity to 4-NP and 4-OP, but not to β -E (except slightly for DI_0/RC). Since we observed toxicity for β -E in the two strains of cyanobacteria and not in green algae, we may advance that β -E does not enter in phytoplankton having cell wall. This may help to

improve the interpretation of the results obtained in previous reports showing that there was no accumulation of estradiol in several green algal species (Della Greca *et al.*, 2008).

Those differences observed between responses of algae and cyanobacteria to EDs could also be explained by their morphological and metabolic properties as it was discussed previously for other xenobiotics (Drábková, Admiraal et Maršálek, 2007 ; Juneau *et al.*, 2001 ; van der Grinten *et al.*, 2010 ; Weiner, DeLorenzo et Fulton, 2004). It can be suggested that the sensitivity of cyanobacteria against different pollutants is related to their prokaryotic nature. Indeed, cyanobacterial cells lack compartmentalization and therefore, their genetic information is not contained in a nucleus, light-harvesting complexes are not enclosed in chloroplast and are directly exposed to the cytoplasm and therefore, the photosynthetic apparatus has a direct connection with plasma membrane of the cell (Drábková *et al.*, 2007 ; Halling-Sorensen, 2000 ; van der Grinten *et al.*, 2010). Moreover, these organisms may have less elaborated enzymatic antioxidant pathways (Drábková *et al.*, 2007).

If we look at the response of *M. aeruginosa* strains more closely, we can point out that these two strains were affected differently by the EDs tested here. Indeed, the non toxic strain of *M. aeruginosa* (CPCC632) was shown to be the most sensitive to 4-NP since the PSII energy fluxes were affected, at least by 10%, at concentrations ranging from 0.25 to 5 µg/mL. On the other hand, the toxic strain of *M. aeruginosa* (CPCC299) was not affected by 4-NP (except at the highest concentration for DI₀/RC). Both cyanobacterial strains were affected by 4-OP and β-E, with concentrations ranging from 0.1 to 5 µg/mL, but *M. aeruginosa* (CPCC632) seemed to be more sensitive (Figures 5.4 and 5.6, and table I). These results differ from what was observed previously by Wang *et al.* (2007), where growth of a toxic strain of *M. aeruginosa* was more affected than a non-toxic strain by concentrations of NP higher than 1 µg/mL. The difference between the conclusions of the two studies might be due to different growth conditions and *M. aeruginosa* strains studied. Therefore, in order to establish a clear relationship between ED effect and sensitivity of toxic and non-toxic strains of *M. aeruginosa*, a wider survey with different strains should be done.

5.6 Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that non target organisms may be greatly influenced by endocrine disrupters. Indeed, even if green algae and cyanobacteria do not have endocrine system, 4-Nonylphenol, 4-Octylphenol and β -Estradiol affected energy fluxes at the photosystem II level. Although the concentrations of EDs used in our study are unlikely to be found in aquatic ecosystems, this work indicates the ability of EDs to affect photosynthetic processes of algae and cyanobacteria. Further research is therefore needed to examine the long-term effect of ED exposure at lower concentrations on these organisms.

5.7 Acknowledgments

This research was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) awarded to P.J.. M-C.P. received a M.Sc. scholarship from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors thank F. Bellemare and N. Boucher from Lab-Bell inc. for their useful discussions.

5.8 References

- Ahel, M., et W. Giger. 1993. «Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents». *Chemosphere*, vol. 26, no 8, p. 1471-1478.
- Ahel, M., W. Giger et M. Koch. 1994. «Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment». *Water Research*, vol. 28, no 5, p. 1131-1142.
- Anderson, M. J., M. R. Miller et D. E. Hinton. 1996. «In vitro modulation of 17- β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells». *Aquatic Toxicology*, vol. 34, p. 327-350.
- Andrew, M. N., R. H. Dunstan, W. A. O'Connor, L. Van Zwieten, B. Nixon et G. R. MacFarlane. 2008. «Effects of 4-nonylphenol and 17 α -ethynylestradiol exposure in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*: Vitellogenin induction and gonadal development». *Aquatic Toxicology*, vol. 88, no 1, p. 39-47.
- Baptista, M. S., T. Stoichev, M. C. P. Basto, V. M. Vasconcelos et M. T. S. D. Vasconcelos. 2009. «Fate and effects of octylphenol in a *Microcystis aeruginosa* culture medium». *Aquatic Toxicology*, vol. 92, p.59-64.
- Belfroid, A. C., A. Van Der Horst, A. D. Vethaak, A. J. Schäfer, G. B. J. Rijs, J. Wegener et W. P. Cofino. 1999. «Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands». *Science of the Total Environment*, vol. 225, no 1-2, p. 101-108.
- Bennie, D. T. 1999. «Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates». *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 34, no 1, p. 79-122.
- Bennie, D. T., C. A. Sullivan, H. B. Lee, T. E. Peart et R. J. Maguire. 1997. «Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River». *Science of the Total Environment*, vol. 193, no 3, p. 263-275.
- Blaise, C., F. Gagné, M. Salazar, S. Salazar, S. Trottier et P. D. Hansen. 2003. «Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 12, no 8, p. 865-870.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, S. Lardy, S. Augagneur et H. Budzinski. 2007. «Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora*

- affinis (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates». *Chemosphere*, vol. 70, no 2, p. 281-287.
- Cargouët, M., D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak et Y. Levi. 2004. «Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)». *Science of the Total Environment*, vol. 324, no 1-3, p. 55-66.
- Céspedes, R., S. Lacorte, A. Ginebreda et D. Barceló. 2008. «Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain)». *Environmental Pollution*, vol. 153, no 2, p. 384-392.
- Chalifour, A., P.A. Spear, M.H. Boily, C. Deblois, I. Giroux, N. Dassilva et P. Juneau. 2009. «Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 91, p. 1315-1329.
- Chen, Z., P. Juneau et B. Qiu. 2007. «Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (Nostoc)». *Aquatic Toxicology*, vol. 81, no 3, p. 256-265.
- Correa-Reyes, G., M. T. Viana, F. J. Marquez-Rocha, A. F. Licea, E. Ponce et R. Vazquez-Duhalt. 2007. «Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain». *Chemosphere*, vol. 68, no 4, p. 662-670.
- Della Greca, M., G. Pinto, P. Pistillo, A. Pollio, L. Previtera et F. Temussi. 2008. «Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae». *Chemosphere*, vol. 70, no 11, p. 2047-2053.
- Drábková, M., W. Admiraal et B. Maršálek. 2007. «Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms». *Environmental Science and Technology*, vol. 41, no 1, p. 309-314.
- Drábková, M., H. C. P. Matthijs, W. Admiraal et B. Maršálek. 2007. «Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis». *Photosynthetica*, vol. 45, no 3, p. 363-369.
- El Jay, A. 1996. «Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 31, no 1, p. 84-90.
- Escher, B. I., N. Bramaz, R. I. L. Eggen et M. Richter. 2005a. «In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life». *Environmental Science and Technology*, vol. 39, no 9, p. 3090-3100.

- Escher, B. I., N. Bramaz, M. Maurer, M. Richter, D. Sutter, C. Von Känel et M. Zschokke. 2005b. «Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, no 3, p. 750-758.
- Eullaffroy, P., C. Frankart, A. Aziz, M. Couderchet et C. Blaise. 2009. «Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides». *Aquatic Botany*, vol. 90, no 2, p. 172-178.
- European Commission. 1997. «European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and the environment». D.G. XII. Environment and Climate Research Program, European Commission, Report EUR 17549. Luxembourg.
- European Commission. 2005. «Common implementation strategy for the Water Framework Directive: environmental quality standards. Octylphenols (para-tert-octylphenol)». Brussels.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. Van Rensen. 2003. «New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test». *Photosynthesis Research*, vol. 78, no 1, p. 17-33.
- Gagné, F., C. André et C. Blaise. 2005. «Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β ». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 14, no 10, p. 861-866.
- Gross-Sorokin, M. Y., E. P. M. Grist, M. Cooke et M. Crane. 2003. «Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: How important is feeding rate?». *Environmental Science and Technology*, vol. 37, no 10, p. 2236-2241.
- Hale, R. C., C. L. Smith, P. O. De Fur, E. Harvey, E. O. Bush, M. J. La Guardia et G. G. Vadas. 2000. «Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, no 4 I, p. 946-952.
- Halling-Sorensen, B. 2000. «Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming». *Chemosphere*, vol. 40, no 7, p. 731-739.
- Hense, B. A., G. F. Severin, G. Pfister, G. Welzl, W. Jaser et K. W. Schramm. 2005. «Effects of anthropogenic estrogens nonylphenol and 17 α -ethinylestradiol in aquatic model ecosystems». *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, vol. 33, no 1, p. 27-37.
- Isidori, M., M. Lavorgna, A. Nardelli et A. Parrella. 2006. «Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols». *Chemosphere*, vol. 64, no 1, p. 135-143.
- Isobe, T., H. Nishiyama, A. Nakashima et H. Takada. 2001. «Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan

- area: Their association with aquatic particles and sedimentary distributions». *Environmental Science and Technology*, vol. 35, no 6, p. 1041-1049.
- Juneau, P., D. Dewez, S. Matsui, S. G. Kim et R. Popovic. 2001. «Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry». *Chemosphere*, vol. 45, no 4-5, p. 589-598.
- Juneau, P., B. Qiu et C. P. Deblois. 2007. «Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 609-625.
- Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. «Neue versuche zur kohlendäure assimilation». *Naturwissenschaften*, vol. 19, p. 964.
- Knorr, S., et T. Braunbeck. 2002. «Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 51, no 3, p. 187-196.
- Koh, Y. K. K., J. N. Lester et M. D. Scrimshaw. 2005. «Fate and behavior of alkylphenols and their polyethoxylates in an activated sludge plant». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 75, no 6, p. 1098-1106.
- Krüger, G. H. J., M. Tsimilli-Michael et R. J. Strasser. 1997. «Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves». *Physiologia Plantarum*, vol. 101, no 2, p. 265-277.
- Lavergne, J., et E. Leci. 1993. «Properties of inactive Photosystem II centers». *Photosynthesis Research*, vol. 35, no 3, p. 323-343.
- Lee, P. C., et W. Lee. 1996. «In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 57, no 3, p. 341-348.
- Loos, R., B. M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini et G. Bidoglio. 2009. «EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters». *Environmental Pollution*, vol. 157, no 2, p. 561-568.
- Lussier, S. M., D. Champlin, J. LiVolsi, S. Poucher et R. J. Pruell. 2000. «Acute toxicity of para-nonylphenol to saltwater animals». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, no 3, p. 617-621.
- Mohapatra, P. K., R. Khillar, B. Hansdah et R. C. Mohanty. 2010. «Photosynthetic and fluorescence responses of *Solanum melangena* L. to field application of dimethoate». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 1, p. 78-83.

- Nimrod, A. C., et W. H. Benson. 1996. «Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 26, no 3, p. 335-364.
- Owens, T. G. 1996. «Processing of excitation energy by antenna pigments.». In *Photosynthesis and the Environment*, N. R. Baker, p. 1-23. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Pedersen, K. H., S. N. Pedersen, K. L. Pedersen, B. Korsgaard et P. Bjerregaard. 2003. «Estrogenic effect of dietary 4-tert-octylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 62, no 4, p. 295-303.
- Ralph, P. J., R. A. Smith, C. M. O. MacInnis-Ng et C. R. Seery. 2007. «Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 589-607.
- Rey Vázquez, G., F. J. Meijide, R. H. Da Cuña, F. L. Lo Nostro, Y. G. Piazza, P. A. Babay, V. L. Trudeau, M. C. Maggese et G. A. Guerrero. 2009. «Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)». *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 150, no 2, p. 298-306.
- Samson, G., O. Prášil et B. Yaakoubd. 1999. «Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence». *Photosynthetica*, vol. 37, no 2, p. 163-182.
- Schreiber, U., P. Quayle, S. Schmidt, B. I. Escher et J. F. Mueller. 2007. «Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging». *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no 11, p. 2554-2563.
- Segner, H., J. M. Navas, C. Schäfers et A. Wenzel. 2003. «Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 54, no 3, p. 315-322.
- Servos, M., D. Bennie, K. Burnison, P. Cureton, N. Davidson et T. Rawn. 2001. «Uncertainties associated with assessing the risk of an endocrine active substance in the Canadian environment». *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 36, no 2, p. 319-330.
- Shao, B., J. Hu et M. Yang. 2003. «Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 70, no 3, p. 527-532.
- Soares, A., B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell et J. N. Lester. 2008. «Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters». *Environment International*, vol. 34, no 7, p. 1033-1049.

- Stein, J. 1972. «*Culture methods and growth measurements*». Cambridge University Press, 448 p.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. «Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria». *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, no 1, p. 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. «The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples». In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, p. 445-483. London: Taylor & Francis.
- Strasser, R. J., et B.J. Strasser. 1995. «Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test». In *Photosynthesis from Light to Biosphere*, P. Mathis, p. 977-980. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R. D. Wilken et M. Servos. 1999. «Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil». *Science of the Total Environment*, vol. 225, no 1-2, p. 81-90.
- Toomey, B. H., G. H. Monteverdi et R. T. Di Giulio. 1999. «Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, no 4, p. 734-739.
- Trebst, A. 2007. «Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system». *Photosynthesis Research*, vol. 92, no 2, p. 217-224.
- van der Grinten, E., M. G. Pikkemaat, E. J. van den Brandhof, G. J. Stroomberg et M. H. S. Kraak. 2010. «Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics». *Chemosphere*, vol. 80, no 1, p. 1-6.
- Vazquez-Duhalt, R., F. Marquez-Rocha, E. Ponce, A. F. Licea et M. T. Viana. 2006. «Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review». *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 4, no 1, p. 1-25.
- Wang, J., et P. Xie. 2007. «Antioxidant enzyme activities of *Microcystis aeruginosa* in response to nonylphenols and degradation of nonylphenols by *M. aeruginosa*». *Environmental geochemistry and health*, vol. 29, no 5, p. 375-383.
- Wang, J., P. Xie et N. Guo. 2007. «Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains». *Environmental Research*, vol. 103, no 1, p. 70-78.
- Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo et M. H. Fulton. 2004. «Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species». *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no 2, p. 121-128.

5.9 Figure legend

Figure 5.1 Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 5 ppm of 4-nonylphenol (○), plotted on a logarithmic time scale. In the insert, the same kinetics are expressed as the relative fluorescence, $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$. *P. subcapitata* with typical chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D).

Figure 5.2 JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 5ppm of 4-nonylphenol and dark-adapted for 15 minutes. *P. subcapitata* (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D). * indicates a significant difference from the control ($P < 0.05$).

Figure 5.3 Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 5 ppm of 4-octylphenol (○), plotted on a logarithmic time scale. In the insert, the same kinetics are expressed as the relative fluorescence, $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$. *P. subcapitata* with typical chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D).

Figure 5.4 JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 5ppm of 4-octylphenol and dark-adapted for 15 minutes. *P. subcapitata* (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D). * indicates a significant difference from control ($P < 0.05$).

Figure 5.5 Rapid rise fluorescence kinetics for control (●) and for cyanobacteria and algae exposed to 4 ppm of β -estradiol (○), plotted on a logarithmic time scale. In the insert, the same kinetics are expressed as the relative fluorescence, $V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)$. *P. subcapitata* with typical chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D).

Figure 5.6 JIP test parameters expressed as a percentage of the control when green algae and cyanobacteria were treated with 4ppm of β -estradiol and dark-adapted for 15 minutes. *P. subcapitata* (A), *C. reinhardtii* (B), *M. aeruginosa* CPCC632 (C), *M. aeruginosa* CPCC299 (D). * indicates a significant difference from the control ($P < 0.05$).

5.10 Figures

Figure 5.1

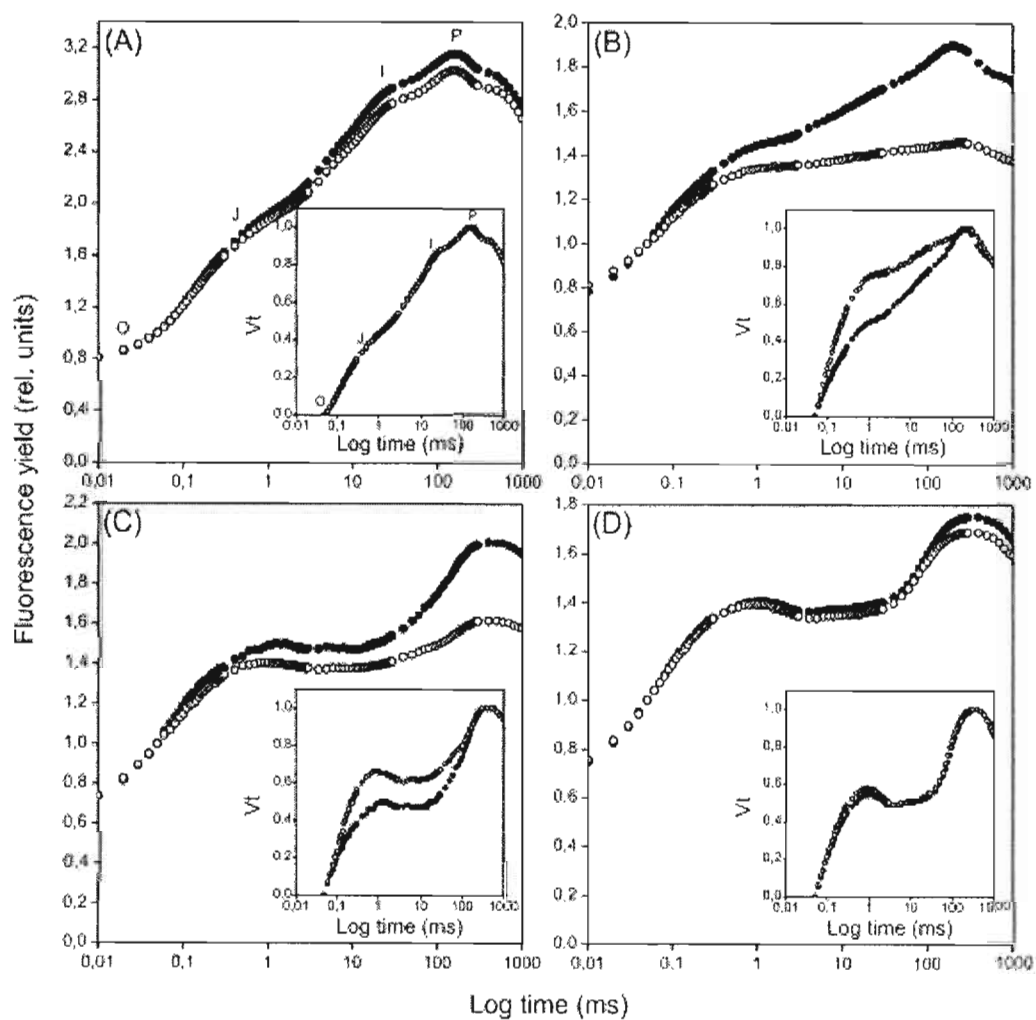


Figure 5.2

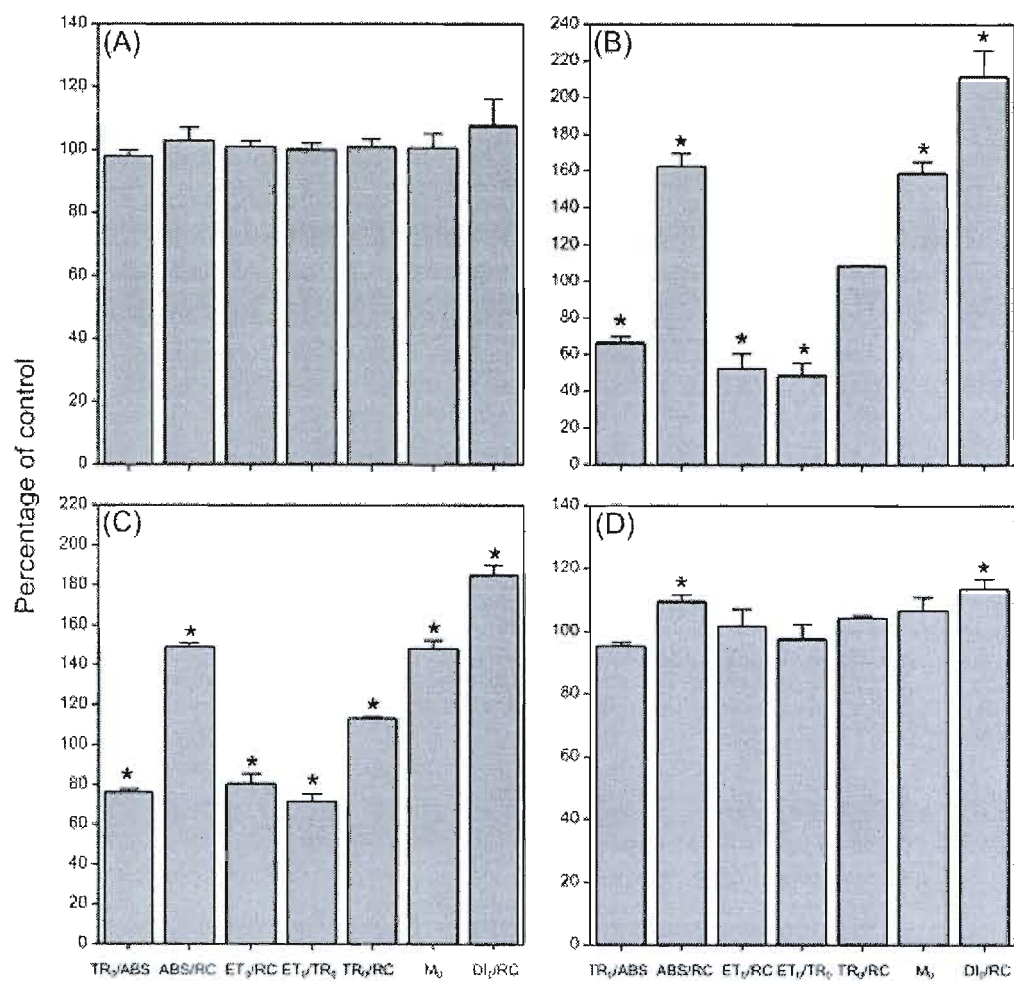


Figure 5.3

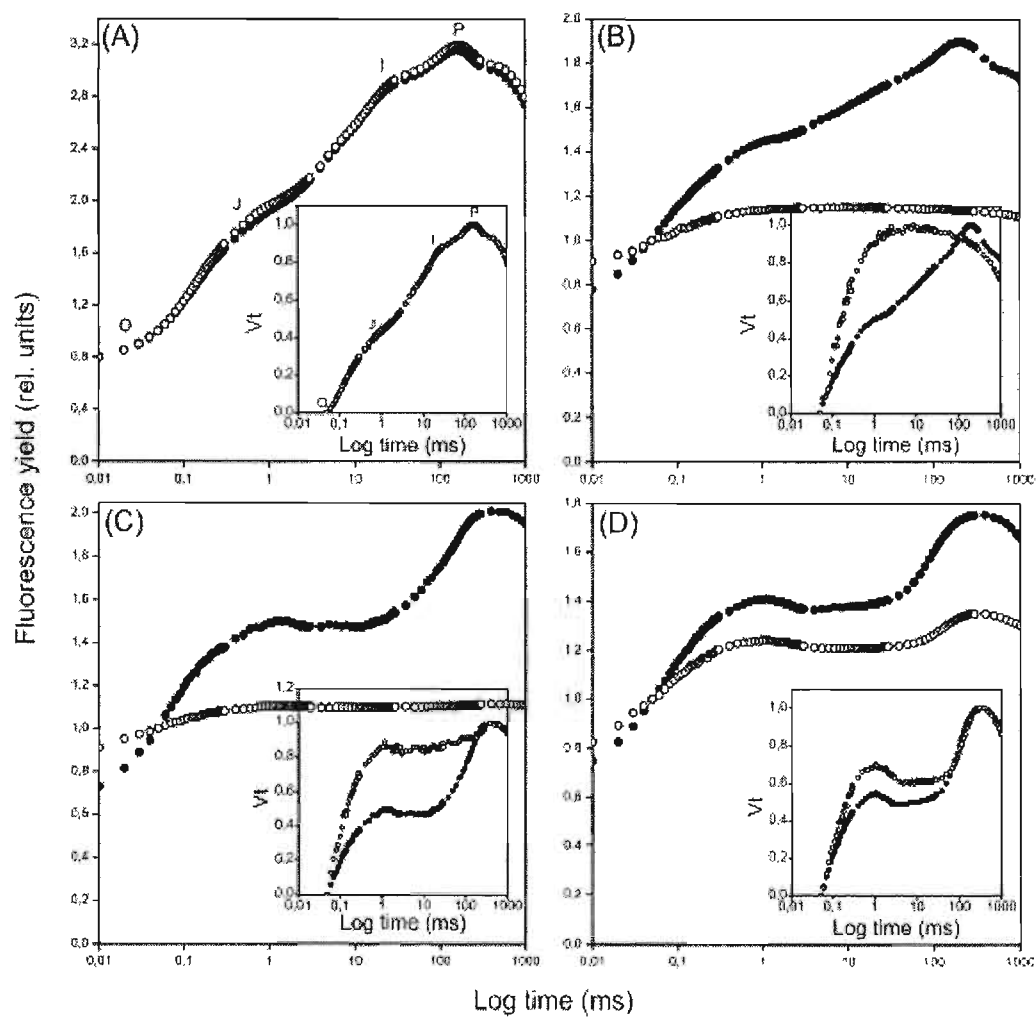


Figure 5.4

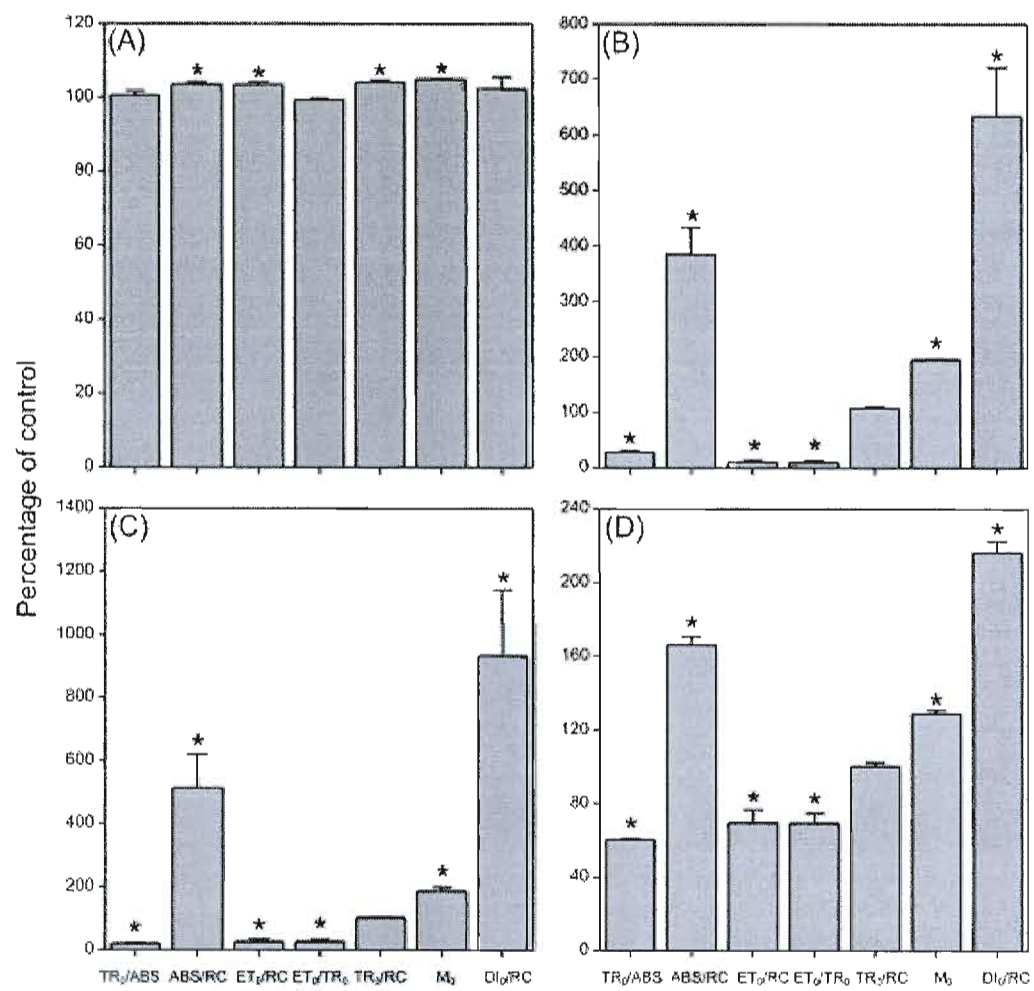


Figure 5.5

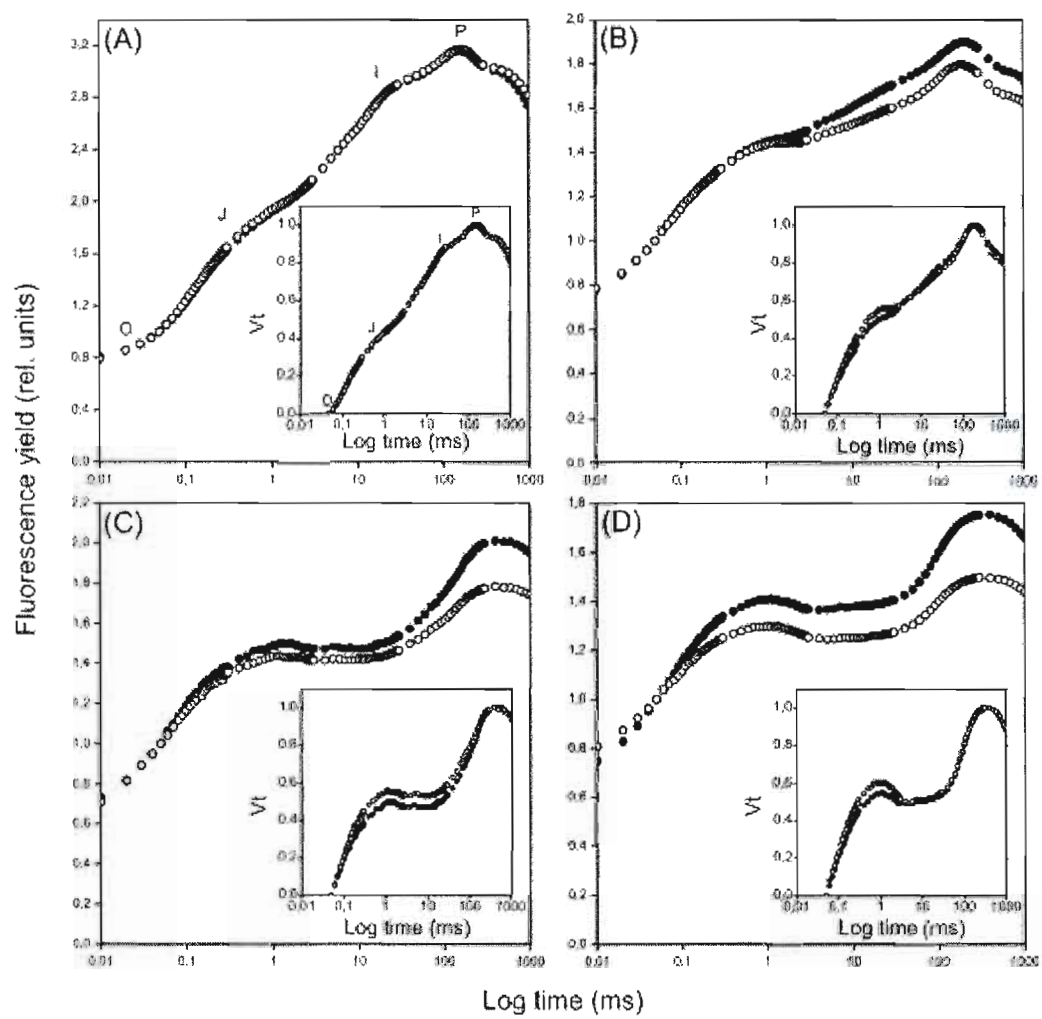
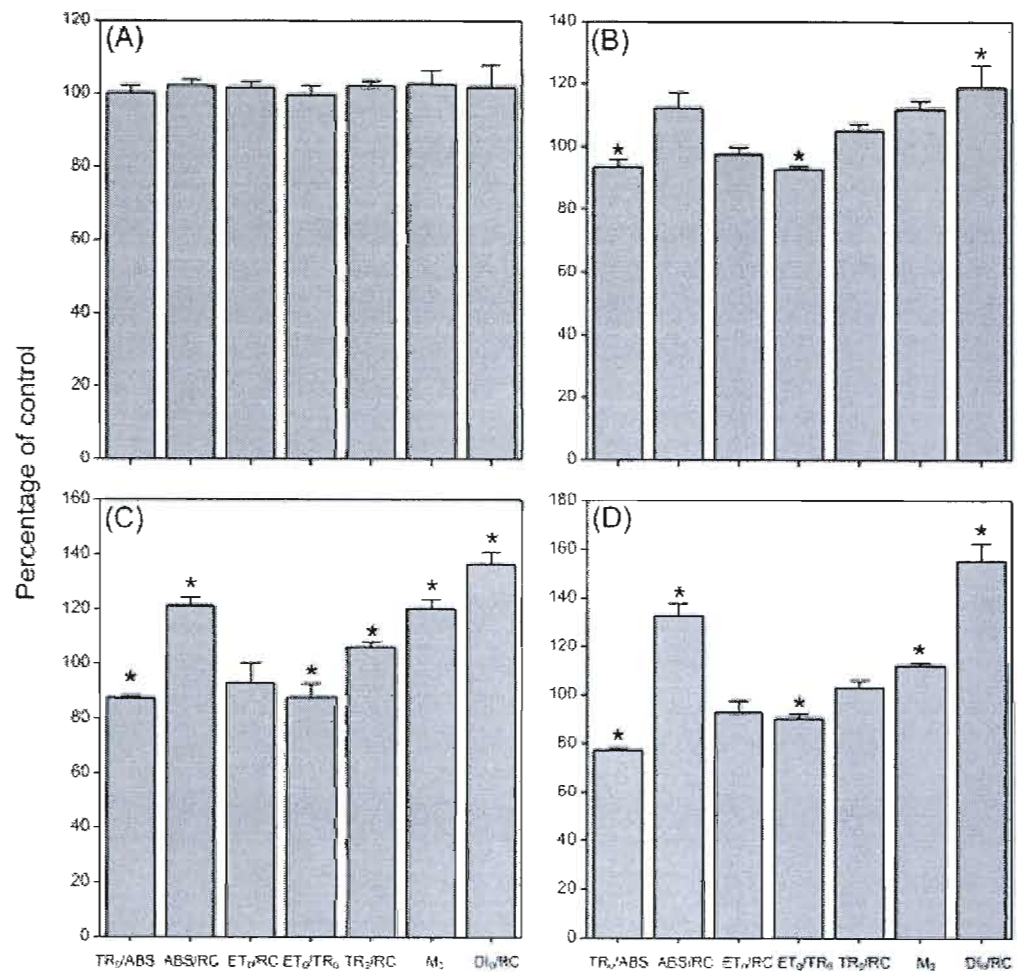


Figure 5.6



5.11 Table

Table 5.1 Effective concentrations ($p < 0.05$) at 10% of the control in $\mu\text{g/mL}$ for JIP-test parameters calculated from kinetics obtained for each species exposed to the different concentrations of each endocrine disrupter.

4-Nonylphenol				
JIP-test parameters	<i>P. subcapitata</i> CPCC37	<i>C. reinhardtii</i> CC125	<i>M. aeruginosa</i> CPCC632	<i>M. aeruginosa</i> CPCC299
TR ₀ /ABS	Ø	5	0.25	Ø
ABS/RC	Ø	0.5	0.25	Ø
ET ₀ /RC	Ø	5	5	Ø
ET ₀ /TR ₀	Ø	5	0.75	Ø
TR ₀ /RC	Ø	Ø	1	Ø
DI ₀ /RC	Ø	0.5	0.25	5
M ₀	Ø	0.5	0.25	Ø
4-Octylphenol				
JIP-test parameters	CPCC37	CC125	CPCC632	CPCC299
TR ₀ /ABS	Ø	0.5	0.1	0.1
ABS/RC	Ø	0.5	0.1	0.1
ET ₀ /RC	Ø	5	5	1
ET ₀ /TR ₀	Ø	5	0.1	0.75
TR ₀ /RC	Ø	Ø	Ø	Ø
DI ₀ /RC	Ø	0.1	0.1	0.1
M ₀	Ø	0.5	0.1	0.5
β-Estradiol				
JIP-test parameters	CPCC37	CC125	CPCC632	CPCC299
TR ₀ /ABS	Ø	Ø	0.25	0.1
ABS/RC	Ø	Ø	0.25	0.1
ET ₀ /RC	Ø	Ø	Ø	Ø
ET ₀ /TR ₀	Ø	Ø	0.1	1
TR ₀ /RC	Ø	Ø	Ø	Ø
DI ₀ /RC	Ø	4	0.1	0.1
M ₀	Ø	Ø	0.1	4

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons évalué si les bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne du phytoplancton sont efficaces dans l'étude de problématiques environnementales émergentes. Nous avons démontré qu'en seulement 15 minutes d'exposition, l'efficacité photochimique et les flux d'énergie à travers le photosystème II (PSII) sont affectés par les microcystines (MCs) pures et extraites. Nous avons pu établir un ordre de toxicité pour les standards de microcystines, la variante MC-LF étant la plus toxique suivi par la MC-YR, LR et RR. Une toxicité plus grande a été notée pour l'exposition à l'extrait de MCs comparativement à la MC pure équivalente (MC-LR). Cependant, cette différence n'a pu être expliquée par la présence des lipopolysaccharides (LPS), composant principal de la paroi cellulaire des cyanobactéries. Nous avons également démontré que pour les MCs, le LuminoTox s'est avéré plus sensible pour mesurer un effet sur l'efficacité photochimique comparativement au PEA qui, cependant, peut nous indiquer le mode d'action des MCs. La réduction du transport des électrons causée par l'exposition aux MCs peut s'expliquer par l'inactivation des centres réactionnels du PSII. Puisque les MCs sont reconnues pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) chez les organismes photosynthétiques et que ces dernières peuvent causer des dommages importants au niveau du PSII, on peut supposer que l'inactivation des centres réactionnels est liée à la production d'ERO en présence des MCs. Il serait donc intéressant de mesurer la production d'ERO suite à une exposition aux MCs.

De plus, nous avons démontré pour la première fois que les perturbateurs endocriniens ont un effet drastique sur l'efficacité photochimique des algues après seulement 15 minutes de traitement. Le 4-octylphénol, le 4-nonylphénol et le β -estradiol ont tous diminué l'efficacité photochimique phytoplanctonique et affecté les flux d'énergie à travers le PSII de façon similaire. Autant pour les expositions aux MCs que pour celles aux perturbateurs endocriniens, les organismes utilisés ont démontré une différence de sensibilité face aux différents traitements, un point important qui doit être pris en considération lors du choix de l'espèce utilisée comme organisme témoin dans l'élaboration d'un bioessai.

Grâce aux résultats obtenus lors de cette étude, nous pouvons envisager l'utilisation de bioessais basés sur la fluorescence de la chlorophylle *a* dans l'étude de problématiques environnementales émergentes. En effet, ces bioessais constituent un outil précieux afin d'évaluer le potentiel de risque d'un plan d'eau et serviraient de «screening» initial de la toxicité. Ils permettraient de vérifier la salubrité d'un milieu aquatique et ainsi d'évaluer s'il est nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires plus laborieuses et dispendieuses afin d'identifier précisément quel est le contaminant présent. De plus, ils constituent un bioessai rapide et simple d'exécution qui ne nécessite pas une longue période d'exposition, qui est sensible et peu coûteux. Nous avons donc démontré que les bioessais basés sur la fluorescence chlorophyllienne peuvent être utiles dans la détection de polluants émergents tels les perturbateurs endocriniens ou les microcystines.

L'étude de l'effet des mélanges de toxines représente un champ de recherche futur important afin de tenir compte de toutes les formes de cyanotoxines présentes dans un échantillon d'eau. Il est important d'avoir un bioessai qui intègre les interactions possibles entre les variantes de microcystines puisque dans l'environnement, bien que la MC-LR soit la variante qui est la plus souvent retrouvée, les effets toxiques sont habituellement causés par des mélanges de toxines. Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant d'évaluer si les perturbateurs endocriniens testés interagissent ensemble. De plus, l'effet des métabolites secondaires potentiellement toxiques tels que les micropeptins ou les microcins sur l'efficacité photochimique serait une bonne avenue d'étude afin de déterminer quelle substance est responsable de la toxicité démontrée par la souche non toxique de cyanobactérie *M. aeruginosa* CPCC632 et de la plus grande toxicité observée par l'extrait de microcystines provenant de *M. aeruginosa* CPCC299. Finalement, afin d'avoir une batterie de bioessais complète et de s'assurer de la fiabilité des résultats, les microcystines ainsi que les perturbateurs endocriniens devront être testés sur d'autres bioessais. Ces biotests devront être composés de représentants de maillons supérieurs de la chaîne trophique tels que les bioessais utilisant les crustacés (*RapidToxKit* et *ThamnoToxKit*). Les résultats permettront d'élaborer une batterie de bioessais qui est représentative de l'écosystème entier avec des organismes qui ont des sensibilités différentes aux variantes de toxiques.

RÉFÉRENCES

- ABC Laboratories Inc. (1984). Acute Toxicity of Octylphenol to *Selenastrum capricornutum* Printz. Report # 31913. Columbia, MO, USA.
- Abe, T., T. Lawson, J. D. B. Weyers et G. Codd. 1996. «Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves : Implications for current spray irrigation practice». *New Phytologist*, vol. 133, no 4, p. 651-658.
- Adachi, T., K. Yasuda, C. Mori, M. Yoshinaga, N. Aoki, G. Tsujimoto et K. Tsuda. 2005. «Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors». *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, no 5, p. 713-719.
- Adams, D. G. 2000. «Heterocyst formation in cyanobacteria». *Current Opinion in Microbiology*, vol. 3, no 6, p. 618-624.
- Adams, D. G., et P. S. Duggan. 1999. «Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria». *New Phytologist*, vol. 144, no 1, p. 3-33.
- Adler, P., T. Steger-Hartmann et W. Kalbfus. 2001. «Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany». *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, vol. 29, no 4, p. 227-241.
- Agrawal, M. K., D. Bagchi et S. N. Bagchi. 2001. «Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankter, *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India». *Hydrobiologia*, vol. 464, p. 37-44.
- Agrawal, M. K., D. Bagchi et S. N. Bagchi. 2005. «Cysteine and serine protease-mediated proteolysis in body homogenate of a zooplankter, *Moina macrocopa*, is inhibited by the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* PCC7806». *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 141, no 1, p. 33-41.
- Ahel, M., et W. Giger. 1993. «Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents». *Chemosphere*, vol. 26, no 8, p. 1471-1478.
- Ahel, M., W. Giger et M. Koch. 1994. «Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment». *Water Research*, vol. 28, no 5, p. 1131-1142.

- Ait Ali, N. 2008. «Études des mécanismes d'inhibition du transport des électrons photosynthétiques induite par les xénobiotiques affectant les réactions photochimiques du photosystème II». Thèse. Montréal, Université du Québec à Montréal, 161 p.
- An, J., et W. W. Carmichael. 1994. «Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins». *Toxicon*, vol. 32, no 12, p. 1495-1507.
- Anderson, M. J., M. R. Miller et D. E. Hinton. 1996. «In vitro modulation of 17- β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells». *Aquatic Toxicology*, p. 327-350.
- Anderson, W. B., R. M. Slawson et C. I. Mayfield. 2002. «A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure». *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 48, no 7, p. 567-587.
- Andrew, M. N., R. H. Dunstan, W. A. O'Connor, L. Van Zwieten, B. Nixon et G. R. MacFarlane. 2008. «Effects of 4-nonylphenol and 17 α -ethynylestradiol exposure in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*: Vitellogenin induction and gonadal development». *Aquatic Toxicology*, vol. 88, no 1, p. 39-47.
- Aranda-Rodriguez, R., A. Tillmanns, F. M. Benoit, F. R. Pick, J. Harvie et L. Solenaia. 2005. «Pressurized liquid extraction of toxins from cyanobacterial cells». *Environmental Toxicology*, vol. 20, no 3, p. 390-396.
- Aravindakshan, J., et D. G. Cyr. 2005. «Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway». *Biology of Reproduction*, vol. 72, no 5, p. 1232-1240.
- Aravindakshan, J., M. Gregory, D. J. Marcogliese, M. Fournier et D. G. Cyr. 2004a. «Consumption of xenoestrogen-contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function». *Toxicological Sciences*, vol. 81, no 1, p. 179-189.
- Aravindakshan, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D. J. Marcogliese et D. G. Cyr. 2004b. «Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*)». *Toxicological Sciences*, vol. 78, no 1, p. 156-165.
- Atanassova, N., C. McKinnell, K. J. Turner, M. Walker, J. S. Fisher, M. Morley, M. R. Millar, N. P. Groome et R. M. Sharpe. 2000. «Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship, to adult testis size and fertility:

- Evidence for stimulatory effects of low estrogen levels». *Endocrinology*, vol. 141, no 10, p. 3898-3907.
- Atencio, L., I. Moreno, A. I. Prieto, R. Moyano, A. M. Molina et A. M. Cameán. 2008. «Acute effects of microcystins MC-LR and MC-RR on acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.)». *Toxicologic Pathology*, vol. 36, no 3, p. 449-458.
- Atienzar, F. A., Z. Billingham et M. H. Depledge. 2002. «4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae». *Environmental Pollution*, vol. 120, no 3, p. 735-738.
- Aydogan, M., et N. Barlas. 2006. «Effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on the reproductive tract of male rats at adulthood». *Reproductive Toxicology*, vol. 22, no 3, p. 455-460.
- Azpiroz, M. F., et M. Laviña. 2007. «Modular structure of microcin H47 and colicin V». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no 7, p. 2412-2419.
- Babica, P., L. Bláha et B. Maršálek. 2006. «Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms». *Journal of Phycology*, vol. 42, no 1, p. 9-20.
- Babica, P., K. Hilscherova, K. Bartova, L. Bláha et B. Maršálek. 2007. «Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs». *Phycologia*, vol. 46, no 2, p. 137-142.
- Baptista, M. S., T. Stoichev, M. C. P. Basto, V. M. Vasconcelos et M. T. S. D. Vasconcelos. 2009. «Fate and effects of octylphenol in a *Microcystis aeruginosa* culture medium». *Aquatic Toxicology*, vol. 92, p. 59-64.
- Barbagallo, R. P., K. Oxborough, K. E. Pallett et N. R. Baker. 2003. «Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging». *Plant Physiology*, vol. 132, no 2, p. 485-493.
- Barford, D., et J. C. Keller. 1994. «Co-crystallization of the catalytic subunit of the serine/threonine specific protein phosphatase 1 from human in complex with microcystin LR». *Journal of Molecular Biology*, vol. 235, no 2, p. 763-766.
- Beauregard, T., et J. Ridal. 2000. «Evaluation of six simple bioassays for the determination of drinking water quality-Canadian results». *Environmental Toxicology*, vol. 15, no 4, p. 304-311.
- Bechi, N., F. Ietta, R. Romagnoli, S. Focardi, I. Corsi, C. Buffi et L. Paulesu. 2006. «Estrogen-like response to p-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells». *Toxicological Sciences*, vol. 93, no 1, p. 75-81.

- Belfroid, A. C., A. Van Der Horst, A. D. Vethaak, A. J. Schäfer, G. B. J. Rijs, J. Wegener et W. P. Cofino. 1999. «Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands». *Science of the Total Environment*, vol. 225, no 1-2, p. 101-108.
- Bellemare, F., M. E. Rouette, L. Lorrain, E. Perron et N. Boucher. 2006. «Combined use of photosynthetic enzyme complexes and microalgal photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity». *Environmental Toxicology*, vol. 21, no 5, p. 445-449.
- Bennie, D. T. 1999. «Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates». *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 34, no 1, p. 79-122.
- Bennie, D. T., C. A. Sullivan, H. B. Lee, T. E. Peart et R. J. Maguire. 1997. «Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River». *Science of the Total Environment*, vol. 193, no 3, p. 263-275.
- Berry, J. P., M. Gantar, M. H. Perez, G. Berry et F. G. Noriega. 2008. «Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides». *Marine Drugs*, vol. 6, no 2, p. 117-146.
- Berry, J. P., et O. Lind. 2010. «First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in "tegogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*)». *Toxicon*, vol. 55, no 5, p. 930-938.
- Best, J. H., F. B. Eddy et G. A. Codd. 2003. «Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum». *Aquatic Toxicology*, vol. 64, no 4, p. 419-426.
- Bester, K., N. Theobald et H. Fr Schröder. 2001. «Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German bight of the North Sea». *Chemosphere*, vol. 45, no 6-7, p. 817-826.
- Bi Fai, P., A. Grant et B. Reid. 2007. «Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 26, no 7, p. 1520-1531.
- Bicknell, R. J., A. E. Herbison et J. P. Sumpter. 1995. «Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents». *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 54, no 1-2, p. 7-9.

- Bieler, S., F. Silva, C. Soto et D. Belin. 2006. «Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease». *Journal of Bacteriology*, vol. 188, no 20, p. 7049-7061.
- Blair, R. M., H. Fang, W. S. Branham, B. S. Hass, S. L. Dial, C. L. Moland, W. Tong, L. Shi, R. Perkins et D. M. Sheehan. 2000. «The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands». *Toxicological Sciences*, vol. 54, no 1, p. 138-153.
- Blaise, C. 1991. «Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects». *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 6, no 2, p. 145-155.
- Blaise, C. 1998. «Microbiotesting: An expanding field in aquatic toxicology». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 40, no 1-2, p. 115-119.
- Blaise, C., F. Gagné, M. Salazar, S. Salazar, S. Trottier et P. D. Hansen. 2003. «Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 12, no 8, p. 865-870.
- Briand, J. F., S. Jacquet, C. Bernard et J. F. Humbert. 2003. «Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems». *Veterinary Research*, vol. 34, no 4, p. 361-377.
- Brook, D., M. Crookes, I. Johnson, R. Mitchell et C. Watts (2005). Priorisation of alkylphenols for environmental risk assessment. Bristol, U. K., National Center for Ecotoxicology and Hazardous Substances, Environmental Agency
- Brooke, L., et G. Thursby (2005). Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Report for the United States EPA. Washington, DC, USA., Office of Science and Technology
- Bury, N. R., G. Flik, F. B. Eddy et G. A. Codd. 1996. «The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca^{2+} transport and Na^+/K^+ -ATPase in tilapia gills». *Journal of Experimental Biology*, vol. 199, no 6, p. 1319-1326.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, S. Lardy, S. Augagneur et H. Budzinski. 2007. «Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates». *Chemosphere*, vol. 70, no 2, p. 281-287.
- Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson et G. Oquist. 1998. «Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no 3, p. 667-683.

- Cargouët, M., D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak et Y. Levi. 2004. «Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)». *Science of the Total Environment*, vol. 324, no 1-3, p. 55-66.
- Carmichael, W. W. 1992. «Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins». *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 72, no 6, p. 445-459.
- Carmichael, W. W. 1997. «The cyanotoxins». *Advances in Botanical Research*, vol. 27, p. 211-256.
- Carmichael, W. W., S. M. F. O. Azevedo, J. S. An, R. J. R. Molica, E. M. Jochimsen, S. Lau, K. L. Rinehart, G. R. Shaw et G. K. Eaglesham. 2001. «Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins». *Environmental Health Perspectives*, vol. 109, no 7, p. 663-668.
- Carmichael, W. W., V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. I. Harada, T. Krishnamurthy, M. J. Yu, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg et M. Watanabe. 1988. «Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)». *Toxicon*, vol. 26, no 11, p. 971-973.
- Casper-Lindley, C., et O. Björkman. 1998. «Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments». *Photosynthesis Research*, vol. 56, no 3, p. 277-289.
- Castillo, G., et L. Schäfer. 2000. «Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A chilean experience». *Environmental Toxicology*, vol. 15, no 4, p. 331-337.
- Cathum, S., et H. Sabik. 2001. «Determination of steroids and coprostanol in surface water, effluent and mussel using gas chromatography-mass spectrometry». *Chromatographia*, vol. 53, no SPEC. ISS.
- Céspedes, R., S. Lacorte, A. Ginebreda et D. Barceló. 2008. «Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain)». *Environmental Pollution*, vol. 153, no 2, p. 384-392.
- Chalifour, A., P.A. Spear, M.H. Boily, C. Deblois, I. Giroux, N. Dassilva et P. Juneau. 2009. «Assessment of toxic effects of pesticide extracts on different green algal species by using chlorophyll a fluorescence». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 91, p. 1315-1329.
- Chen, Y. M., T. H. Lee, S. J. Lee, H. B. Huang, R. Huang et H. N. Chou. 2006. «Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins». *Toxicon*, vol. 47, no 7, p. 742-746.

- Chen, Z., P. Juneau et B. Qiu. 2007. «Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (Nostoc)». *Aquatic Toxicology*, vol. 81, no 3, p. 256-265.
- Clara, M., B. Strenn, E. Saracevic et N. Kreuzinger. 2004. «Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiol and 17 α - ethinylestradiol to sewage sludge». *Chemosphere*, vol. 56, no 9, p. 843-851.
- Codd, G. A. 2000. «Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control». *Ecological Engineering*, vol. 16, no 1, p. 51-60.
- Codd, G. A., S. G. Bell, K. Kaya, C. J. Ward, K. A. Beattie et J. S. Metcalf. 1999. «Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health». *European Journal of Phycology*, vol. 34, no 4, p. 405-415.
- Codd, G. A., L. F. Morrison et J. S. Metcalf. 2005. «Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 203, no 3 SPEC. ISS., p. 264-272.
- Codd, G., J. Lindsay, F. M. Young, L. F. Morrison et J. S. Metcalf. 2005. «Harmful cyanobacteria, from mass mortalities to management measures». In *Harmful Cyanobacteria*, J. Huisman, H.C.P. Matthijs et P. M. Visser, p. 1-23. New York: Springer.
- Comité de la prévention et de la précaution. (2003). Les perturbateurs endocriniens: quels risques? Paris, Ministère de l'écologie et du développement durable
- Correa-Reyes, G., M. T. Viana, F. J. Marquez-Rocha, A. F. Licea, E. Ponce et R. Vazquez-Duhalt. 2007. «Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain». *Chemosphere*, vol. 68, no 4, p. 662-670.
- Crump, D., D. Lean et V. L. Trudeau. 2002. «Octylphenol and UV-B radiation alter larval development and hypothalamic gene expression in the leopard frog (*Rana pipiens*)». *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no 3, p. 277-284.
- Dao, T. S., L. C. Do-Hong et C. Wiegand. 2010. «Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring». *Toxicon*, vol. 55 no 7, p. 1244-1254.
- De Mes, T., G. Zeeman et G. Lettinga. 2005. «Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α - ethinylestradiol in STPs for domestic wastewater». *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 4, no 4, p. 275-311.
- Debenest, T., F. Gagné, A. N. Petit, C. André, M. Kohli et C. Blaise. 2010. «Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic

- organisms». *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 152, no 4, p. 407-412.
- Deblois, C. P., R. Aranda-Rodriguez, A. Giani et D. F. Bird. 2008. «Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs». *Toxicon*, vol. 51, no 3, p. 435-448.
- Deblois, C. P., et P. Juneau. 2010. «Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances». *Harmful Algae*, vol. 9, no 1, p. 18-24.
- Della Greca, M., G. Pinto, P. Pistillo, A. Pollio, L. Previtera et F. Temussi. 2008. «Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae». *Chemosphere*, vol. 70, no 11, p. 2047-2053.
- Dellamatrice, P. M., R. T. R. Monteiro, C. Blaise, J. L. Slabbert, F. Gagne et S. Alleau. 2006. «Toxicity assessment of reference and natural freshwater sediments with the LuminoTox assay». *Environmental Toxicology*, vol. 21, no 4, p. 395-402.
- Dewez, D., N. Boucher, F. Bellemare et R. Popovic. 2007. «Use of different fluorometric systems in the determination of fluorescence parameters from spinach thylakoid membranes being exposed to atrazine and copper». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 655-664.
- Dimier, C., S. Giovanni, T. Ferdinando et C. Brunet. 2009. «Comparative Ecophysiology of the Xanthophyll Cycle in Six Marine Phytoplanktonic Species ». *Protist*, vol. 160, no 3, p. 397-411.
- Dörr, F. A., E. Pinto, R. M. Soares et S. M. Feliciano de Oliveira e Azevedo. 2010. «Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays». *Toxicon*, vol. 56, no 7, p. 1247-1256.
- Drábková, M., W. Admiraal et B. Maršálek. 2007. «Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms». *Environmental Science and Technology*, vol. 41, no 1, p. 309-314.
- Drábková, M., H. C. P. Matthijs, W. Admiraal et B. Maršálek. 2007. «Selective effects of H₂O₂ on cyanobacterial photosynthesis». *Photosynthetica*, vol. 45, no 3, p. 363-369.
- Drastichová, J., Z. Svobodová, M. Groenland, R. Dobšíková, V. Žlábek, D. Weissová et M. Szotkowská. 2005. «Effect of exposure to bisphenol A and 17 β -estradiol on the sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*)». *Acta Veterinaria Brno*, vol. 74, no 2, p. 287-291.
- Drobniewska, A., M. Tarczyska, J. Mankiewicz, T. Jurczak et M. Zalewski. 2004. «Increase of crustacean sensitivity to purified hepatotoxic cyanobacterial extracts by

- manipulation of experimental conditions». *Environmental Toxicology*, vol. 19, no 4, p. 416-420.
- Dvořáková, D., K. Dvořáková, L. Bláha et B. Maršálek. 2002. «Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in xenopus laevis: Teratogenesis assay (FETAX)». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 6, p. 547-555.
- El Jay, A. 1996. «Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 31, no 1, p. 84-90.
- El Jay, A., J. M. Ducruet, J. C. Duval et J. P. Pelletier. 1997. «A high-sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: Comparison with effect on cell growth». *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 140, no 2, p. 273-286.
- Environnement Canada. (2009). «Luminotox: outil de dépistage rapide de la toxicité». En ligne : http://www.qc.ec.gc.ca/dpe/Francais/dpe_main_fr.asp?innov_fiche_200503a. Consulté le 5 février 2009.
- Environnement Canada. (2005). LuminoTox: A tool for rapid toxicity testing. Technological Innovation data sheet. Montréal, Québec, Environnement Canada. ISBN 0-662-39710-X.
- Environnement Canada. (2002). Canadian environmental quality guidelines for nonylphenol and its ethoxylates. Scientific supporting document (water, sediment and soil). Environnement Canada Direction de la qualité de l'environnement, Bureau national des recommandations et des normes. Ottawa, Canada
- Environnement Canada. (2001). Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999); Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation sur le nonylphénol et ses dérivés éthoxylés. Ottawa, Environnement Canada, Santé Canada: 117 p.
- Environmental risk management authority, (2007). Candidates for reassessment priority listing: Nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and octylphenol ethoxylates. New Zealand, Environmental risk management authority: 6 p.
- Escher, B. I., N. Bramaz, R. I. L. Eggen et M. Richter. 2005a. «In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life». *Environmental Science and Technology*, vol. 39, no 9, p. 3090-3100.
- Escher, B. I., N. Bramaz, M. Maurer, M. Richter, D. Sutter, C. Von Känel et M. Zschokke. 2005b. «Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, no 3, p. 750-758.

- Eullaffroy, P., C. Frankart, A. Aziz, M. Couderchet et C. Blaise. 2009. «Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides». *Aquatic Botany*, vol. 90, no 2, p. 172-178.
- European Commission (1997). European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and the environment. D.G. XII. Environment and Climate Research Program, European Commission, Report EUR 17549. Luxembourg
- European Commission (2005). Common implementation strategy for the Water Framework Directive: environmental quality standards. Octylphenols (para-tert-octylphenol). Brussels
- Falconer, I. R., M. D. Burch, D. A. Steffensen, M. Choice et O. R. Coverdale. 1994. «Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment». *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 9, no 2, p. 131-139.
- Falkowski, P. G., et J. A. Raven. 2007. *Aquatic photosynthesis*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 484 p.
- Farré, M. I, S. Pérez, L. Kantiani et D. Barcelò. 2008. «Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment». *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, no 11, p. 991-1007.
- Fastner, J., M. Erhard et H. Von Döhren. 2001. «Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no 3-12, p. 5069-5076.
- Fastner, J., I. Flieger et U. Neumann. 1998. «Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures». *Water Research*, vol. 32, no 10, p. 3177-3181.
- Fastner, J., U. Neumann, B. Wirsing, J. Weckesser, C. Wiedner, B. Nixdorf et I. Chorus. 1999. «Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies». *Environmental Toxicology*, vol. 14, no 1, p. 13-22.
- Fawell, J. K., R. E. Mitchell, D. J. Everett et R. E. Hill. 1999. «The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR». *Human and Experimental Toxicology*, vol. 18, no 3, p. 162-167.
- Fénichel, P., et F. Brucker-Davis. 2008. «Breast risk cancer and environmental endocrine disruptors». *Perturbateurs endocriniens environnementaux et cancer du sein : de nouveaux facteurs de risque ?*, vol. 36, no 10, p. 969-977.

- Figà-Talamanca, I., M. Tarquini et L. Lauria. 2003. «Is the sex ratio at birth a good indicator of environmental contamination from endocrine disrupters?». *È possibile utilizzare il sex ratio alla nascita come indicatore di presenza di endocrine disrupters in contaminazioni ambientali?*, vol. 25, no SUPPL. 3, p. 52-53.
- Fochtman, P., A. Raszka et E. Nierzedzka. 2000. «The use of conventional bioassays, microbiotests, and some "rapid" methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity». *Environmental Toxicology*, vol. 15, no 5, p. 376-384.
- Force, L., C. Critchley et J. J. S. Van Rensen. 2003. «New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test». *Photosynthesis Research*, vol. 78, no 1, p. 17-33.
- Gadzała-Kopciuch, R., A. Filipiak, B. Berecka, P. Gomułka et B. Buszewski. 2009. «Selection of extraction method for the estimation of the bioaccumulation factor of 4-N-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in an aquatic system». *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 32, no 7, p. 971-983.
- Gagné, F., C. André et C. Blaise. 2005. «Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 β ». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 14, no 10, p. 861-866.
- Gagné, F., C. Blaise, M. Salazar, S. Salazar et P. D. Hansen. 2001. «Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*». *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 128, no 3, p. 213-225.
- Garcia-Ac, A., P. A. Segura, L. Viglino, A. Fürtös, C. Gagnon, M. Prévost et S. Sauvé. 2009. «On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water». *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, no 48, p. 8518-8527.
- Ghadouani, A., B. Pinel-Alloul et E. E. Prepas. 2003. «Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities». *Freshwater Biology*, vol. 48, no 2, p. 363-381.
- Goldberg, J., H. Huang -b, Y. Kwon -g, P. Greengard, A. C. Nairn et J. Kuriyan. 1995. «Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1». *Nature*, vol. 376, no 6543, p. 745-753.
- Goss, Reimund, et Torsten Jakob. 2010. «Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae». *Photosynthesis Research*, vol. 106, no 1, p. 103-122.

- Graff, L., P. Isnard, P. Cellier, J. Bastide, J. P. Cambon, J. F. Narbonne, H. Budzinski et P. Vasseur. 2003. «Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, no 6, p. 1368-1379.
- Gross-Sorokin, M. Y., E. P. M. Grist, M. Cooke et M. Crane. 2003. «Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: How important is feeding rate?». *Environmental Science and Technology*, vol. 37, no 10, p. 2236-2241.
- Grossman, A. R., M. R. Schaefer, G. G. Chiang et J. L. Collier. 1993. «The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions». *Microbiological Reviews*, vol. 57, no 3, p. 725-749.
- Grün, F., et B. Blumberg. 2009. «Endocrine disrupters as obesogens». *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 304, no 1-2, p. 19-29.
- Grün, F., H. Watanabe, Z. Zamanian, L. Maeda, K. Arima, R. Cubacha, D. M. Gardiner, J. Kanno, T. Iguchi et B. Blumberg. 2006. «Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates». *Molecular Endocrinology*, vol. 20, no 9, p. 2141-2155.
- Gupta, N., S. C. Pant, R. Vijayaraghavan et P. V. L. Rao. 2003. «Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice». *Toxicology*, vol. 188, no 2-3, p. 285-296.
- Haeba, M. H., K. Hilscherová, E. Mazurová et L. Bláha. 2008. «Selected endocrine disrupting compounds (vinclozolin, flutamide, ketoconazole and dicofol): effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*». *Environmental science and pollution research international*, vol. 50, no 3, p. 222-227.
- Hale, R. C., C. L. Smith, P. O. De Fur, E. Harvey, E. O. Bush, M. J. La Guardia et G. G. Vadas. 2000. «Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, no 4 I, p. 946-952.
- Halling-Sorensen, B. 2000. «Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming». *Chemosphere*, vol. 40, no 7, p. 731-739.
- Han, T., S. H. Kang, J. S. Park, H. K. Lee et M. T. Brown. 2008. «Physiological responses of *Ulva pertusa* and *U. armoricana* to copper exposure». *Aquatic Toxicology*, vol. 86, no 2, p. 176-184.
- Han, X. D., Z. G. Tu, Y. Gong, S. N. Shen, X. Y. Wang, L. N. Kang, Y. Y. Hou et J. X. Chen. 2004. «The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats». *Reproductive Toxicology*, vol. 19, no 2, p. 215-221.

- Hankamer, B., E. Morris, J. Nield, A. Carne et J. Barber. 2001. «Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II». *FEBS Letters*, vol. 504, no 3, p. 142-151.
- Harada, K. I. 1996. «Chemistry and detection of microcystins. ». In *Toxic Microcystis*, M. F. Watanabe, Harada, K. I., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (Eds.), p. 103-148. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Harada, K. I., S. Imanishi, H. Kato, M. Mizuno, E. Ito et K. Tsuji. 2004. «Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation». *Toxicon*, vol. 44, no 1, p. 107-109.
- Harada, K. I., T. Mayumi, T. Shimada, K. Fujii, F. Kondo, H. D. Park et M. F. Watanabe. 2001. «Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom». *Environmental Toxicology*, vol. 16, no 4, p. 298-305.
- Hense, B. A., W. Jaser, G. Welzl, G. Pfister, G. F. Wöhler-Moorhoff et K. W. Schramm. 2008. «Impact of 17 α -ethinylestradiol on the plankton in freshwater microcosms-II: Responses of phytoplankton and the interrelation within the ecosystem». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 69, no 3, p. 453-465.
- Hense, B. A., I. Jüttner, G. Welzl, G. F. Severin, G. Pfister, A. Behechti et K. W. Schramm. 2003. «Effects of 4-nonylphenol on phytoplankton and periphyton in aquatic microcosms». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, no 11, p. 2727-2732.
- Hense, B. A., G. F. Severin, G. Pfister, G. Welzl, W. Jaser et K. W. Schramm. 2005. «Effects of anthropogenic estrogens nonylphenol and 17 α -ethinylestradiol in aquatic model ecosystems». *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, vol. 33, no 1, p. 27-37.
- Hense, B. A., G. F. Severin, G. Welzl et K. W. Schramm. 2004. «Effects of 17 α -ethinylestradiol on zoo- and phytoplankton in lentic microcosms». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, no 3, p. 716-724.
- Hopkins, W. G. 2003. *Physiologie végétale, traduction de la 2^e édition américaine*. Bruxelles: De Boeck Université 532 p.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu et D. H. Li. 2004. «Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*». *Environmental Toxicology*, vol. 19, no 6, p. 571-577.
- Hu, Z. Q., Y. D. Liu, D. H. Li et A. Dauta. 2005. «Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* in response to microcystin-RR». *Hydrobiologia*, vol. 534, no 1-3, p. 23-29.

- Huang, D. Y., M. Mock, B. Hagenbuch, S. Chan, J. Dmitrovic, S. Gabos et D. Kinniburgh. 2009. «Dynamic cytotoxic response to microcystins using microelectronic sensor arrays». *Environmental Science and Technology*, vol. 43, no 20, p. 7803-7809.
- Huang, H. Y., Q. Zhang, L. P. Zhao, J. N. Feng et C. L. Peng. 2010. «Does lutein play a key role in the protection of photosynthetic apparatus in arabidopsis under severe oxidative stress?». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 42, no 4, p. 2765-2774.
- Huner, N. P. A., G. Öquist et A. Melis. 2003. «Photostasis in plants, green algae and cyanobacteria: the role of light harvesting antenna complexes». In *Light-Harvesting Antennas*, B. Green et W. Parson, p. 1-16. Düsseldorf: Kluwer Academic Publishers.
- Ikawa, M., J. F. Haney et J. J. Sasner. 1996. «Inhibition of Chlorella growth by the lipids of cyanobacterium Microcystis aeruginosa». *Hydrobiologia*, vol. 331, no 1-3, p. 167-170.
- Ishida, K., et M. Murakami. 2000. «Kasumigamide, an antialgal peptide from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa». *Journal of Organic Chemistry*, vol. 65, no 19, p. 5898-5900.
- Ishida, K., Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino et M. Murakami. 1999. «Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa». *Tetrahedron*, vol. 55, no 36, p. 10971-10988.
- Isidori, M., M. Lavorgna, A. Nardelli et A. Parrella. 2006. «Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on Saccharomyces cerevisiae of eight alkylphenols». *Chemosphere*, vol. 64, no 1, p. 135-143.
- Isidori, M., M. Lavorgna, M. Palumbo, V. Piccioli et A. Parrella. 2007. «Influence of alkylphenols and trace elements in toxic, genotoxic, and endocrine disruption activity of wastewater treatment plants». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 26, no 8, p. 1686-1694.
- Isobe, T., H. Nishiyama, A. Nakashima et H. Takada. 2001. «Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: Their association with aquatic particles and sedimentary distributions». *Environmental Science and Technology*, vol. 35, no 6, p. 1041-1049.
- Ito, E., A. Takai, F. Kondo, H. Masui, S. Imanishi et K. I. Harada. 2002. «Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds». *Toxicon*, vol. 40, no 7, p. 1017-1025.
- Izydorczyk, K., T. Jurczak, A. Wojtal-Frankiewicz, A. Skowron, J. Mankiewicz-Boczek et M. Tarczyska. 2008. «Influence of abiotic and biotic factors on microcystin content in Microcystis aeruginosa cells in a eutrophic temperate reservoir». *Journal of Plankton Research*, vol. 30, no 4, p. 393-400.

- Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen et J. P. Sumpter. 1996. «Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, no 2, p. 194-202.
- Jülich, W. 2000. «Untersuchungen zu endokrin wirksamen Stoffen in den Niederlanden.». *Arbeitstagung der IAWR International Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke im Rheineinzugsgebiet*, vol. 11, no 12, p. 105-124.
- Jürgens, M. D., K. I. E. Holthaus, A.C. Johnson, J. J. L. Smith, M. Hetheridge et R. J. Williams. 2002. «The potential for Estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, no 3, p. 480-488.
- Juneau, P., D. Dewez, S. Matsui, S. G. Kim et R. Popovic. 2001. «Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metolachlor by PAM-fluorometry». *Chemosphere*, vol. 45, no 4-5, p. 589-598.
- Juneau, P., et R. Popovic. 1999. «Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: Importance and future application». *Ecotoxicology*, vol. 8, no 6, p. 449-455.
- Juneau, P., B. Qiu et C. P. Deblois. 2007. «Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 609-625.
- Jungmann, D., et J. Benndorf. 1994. «Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins». *Freshwater Biology*, vol. 32, no 1, p. 13-20.
- Kaebernick, M., et B. A. Neilan. 2001. «Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production». *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 35, no 1, p. 1-9.
- Kardinaal, W. E. A., et P. M. Visser. 2005. «Dynamics of cyanobacterial toxins; Sources of variability in microcystin concentrations». In *Harmful cyanobacteria*, J. Huisman, H. C. P. Matthijs et P. M. Visser, p. 41-57. Netherlands: Springer.
- Katsuda, S. I., M. Yoshida, S. Isagawa, Y. Asagawa, H. Kuroda, T. Watanabe, J. Ando, M. Takahashi et A. Maekawa. 2000. «Dose- and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats». *Reproductive Toxicology*, vol. 14, no 2, p. 119-126.
- Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. «Neue versuche zur kohlenensäure assimilation». *Naturwissenschaften*, vol. 19, p. 964.

- Keil, C., A. Forchert, J. Fastner, U. Szewzyk, W. Rotard, I. Chorus et R. Krätke. 2002. «Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains». *Water Research*, vol. 36, no 8, p. 2133-2139.
- Kenneth, L. H. 2001. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2477 p.
- Key, T. J. A., M. C. Pike, J. B. Brown, C. Hermon, D. S. Allen et D. Y. Wang. 1996. «Cigarette smoking and urinary oestrogen excretion in premenopausal and post-menopausal women». *British Journal of Cancer*, vol. 74, no 8, p. 1313-1316.
- Khurana, S., S. Ranmal et N. Ben-Jonathan. 2000. «Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: Delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression». *Endocrinology*, vol. 141, no 12, p. 4512-4517.
- Kim, J. H., et C. H. Lee. 2005. «In vivo deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves». *Plant Science*, vol. 168, no 4, p. 1115-1125.
- Kinnberg, K., B. Korsgaard, P. Bjerregaard et A. Jespersen. 2000. «Effects of nonylphenol and 17 β -estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*». *Journal of Experimental Biology*, vol. 203, no 2, p. 171-181.
- Klaassen, C. D., M. O. Amdur et J. Doull (1996). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York, McGraw-Hill
- Knauert, S., et K. Knauer. 2008. «The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae». *Journal of Phycology*, vol. 44, no 2, p. 311-319.
- Knorr, S., et T. Braunbeck. 2002. «Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 51, no 3, p. 187-196.
- Koh, Y. K. K., J. N. Lester et M. D. Scrimshaw. 2005. «Fate and behavior of alkylphenols and their polyethoxylates in an activated sludge plant». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 75, no 6, p. 1098-1106.
- Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber et H. T. Buxton. 2002. «Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance». *Environmental Science and Technology*, vol. 36, no 6, p. 1202-1211.

- Krause, H. G., et P. Jahns. 2003. «Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science». In *Light-Harvesting Antennas*, B. Green et W. Parson, p. 1-21. Düsseldorf: Kluwer Academic Publishers.
- Krieger-Liszak, A., C. Fufezan et A. Trebst. 2008. «Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism». *Photosynthesis Research*, vol. 98, no 1-3, p. 551-564.
- Krüger, G. H. J., M. Tsimilli-Michael et R. J. Strasser. 1997. «Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves». *Physiologia Plantarum*, vol. 101, no 2, p. 265-277.
- Kubwabo, C., N. Vais et F. M. Benoit. 2005. «Characterization of microcystins using in-source collision-induced dissociation». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 19, no 5, p. 597-604.
- Kuch, H. M., et K. Ballschmiter. 2001. «Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range». *Environmental Science and Technology*, vol. 35, no 15, p. 3201-3206.
- Kwack, S. J., O. Kwon, H. S. Kim, S. S. Kim, S. H. Kim, K. H. Sohn, R. D. Lee, C. H. Park, E. B. Jeung, B. S. An et K. L. Park. 2002. «Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo». *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, vol. 65, no 5-6, p. 419-431.
- Lab_Bell, Inc. (2007). LuminoTox: Évaluation rapide d'un indice de contamination chimique. Shawinigan, Québec, Canada: 80 p
- Lahti, K., J. Rapala, M. Färdig, M. Niemelä et K. Sivonen. 1997. «Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water». *Water Research*, vol. 31, no 5, p. 1005-1012.
- Lambert, T. W., C. F. B. Holmes et S. E. Hrudey. 1996. «Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment». *Water Research*, vol. 30, no 6, p. 1411-1422.
- Lange, I. G., A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta et H. H. D. Meyer. 2002. «Sex hormones originating from different livestock production systems: Fate and potential disrupting activity in the environment». *Analytica Chimica Acta*, vol. 473, no 1-2, p. 27-37.
- Lavergne, J., et E. Leci. 1993. «Properties of inactive Photosystem II centers». *Photosynthesis Research*, vol. 35, no 3, p. 323-343.

- Lavoie, I., I. Laurion, A. Warren et W. Vincent. 2007. «Les fleurs d'eau de cyanobactéries- Revue de littérature». *INRS* vol. 916, xiii, p. 124.
- Laws, S. C., S. A. Carey, J. M. Ferrell, G. J. Bodman et R. L. Cooper. 2000. «Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats». *Toxicological Sciences*, vol. 54, no 1, p. 154-167.
- Lawton, L. A., P. K. J. Robertson, B. J. P. A. Cornish, I. L. Marr et M. Jaspars. 2003. «Processes influencing surface interaction and photocatalytic destruction of microcystins on titanium dioxide photocatalysts». *Journal of Catalysis*, vol. 213, no 1, p. 109-113.
- Lee, P. C., et W. Lee. 1996. «In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 57, no 3, p. 341-348.
- Lemaire, G., B. Terouanne, P. Mauvais, S. Michel et R. Rahmani. 2004. «Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 196, no 2, p. 235-246.
- Lewis, M. A. 1990. «Are laboratory-derived toxicity data for freshwater algae worth the effort?». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, no 10, p. 1279-1284.
- Lewis, M. A. 1995. «Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review». *Environmental Pollution*, vol. 87, no 3, p. 319-336.
- Lewis, S. K., et J. J. Lech. 1996. «Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Xenobiotica*, vol. 26, no 8, p. 813-819.
- Li, D., M. Kim, W. J. Shim, U. H. Yim, J. R. Oh et Y. J. Kwon. 2004. «Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea». *Chemosphere*, vol. 56, no 1, p. 1-6.
- Liu, Y., Y. Guan, Q. Gao, N. F. Y. Tam et W. Zhu. 2010. «Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*». *Chemosphere*, vol. 80, no 5, p. 592-599.
- Lohrmann, N. L., B. A. Logan et A. S. Johnson. 2004. «Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances». *Biological Bulletin*, vol. 207, no 3, p. 225-232.
- Loos, R., B. M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini et G. Bidoglio. 2009. «EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters». *Environmental Pollution*, vol. 157, no 2, p. 561-568.

- Lovell, R. A., D. J. Schaeffer, S. B. Hooser, W. M. Haschek, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael et V. R. Beasley. 1989. «Toxicity of intraperitoneal doses of microcystin-LR in two strains of male mice». *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, vol. 9, no 3, p. 221-238.
- Lussier, S. M., D. Champlin, J. LiVolsi, S. Poucher et R. J. Pruell. 2000. «Acute toxicity of para-nonylphenol to saltwater animals». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, no 3, p. 617-621.
- MacKintosh, C., K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen et G. A. Codd. 1990. «Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants». *FEBS Letters*, vol. 264, no 2, p. 187-192.
- Magalhaes, V. F., M. M. Marinho, P. Domingos, A. C. Oliveira, S. M Costa, L. O. Azevedo et S. M. F. O. Azevedo. 2003. «Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ)». *Toxicon*, vol. 42, no 3, p. 289-295.
- Martin, C., G. A. Codd, H. W. Siegelman et J. Weckesser. 1989. «Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains». *Archives of Microbiology*, vol. 152, no 1, p. 90-94.
- Maso, M., et E. Garces. 2006. «Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 53, no 10-12, p. 620-630.
- Matsunaga, H., K. I. Harada, M. Senma, Y. Ito, N. Yasuda, S. Ushida et Y. Kimura. 1999. «Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria». *Natural Toxins*, vol. 7, no 2, p. 81-84.
- Maxwell, K., et G. N. Johnson. 2000. «Chlorophyll fluorescence - A practical guide». *Journal of Experimental Botany*, vol. 51, no 345, p. 659-668.
- McCarty, L. S., et C. J. Borgert. 2006. «Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice». *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 45, no 2, p. 119-143.
- McElhiney, J., L. A. Lawton et C. Leifert. 2001. «Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure». *Toxicon*, vol. 39, no 9, p. 1411-1420.
- Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs. 2009. «Bilan des lacs et cours d'eau touchés par les fleurs d'eau d'algues bleu-vert au Québec». En ligne : http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/algues-bv/bilan/liste_comparative.asp. Consulté le 30 janvier 2009.

- Metcalf, J. S., S. G. Bell et G. A. Codd. 2001. «Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no 2, p. 904-909.
- Miles, Donald. 1990. «Role of chlorophyll fluorescence as a bioassay for assessment of toxicity in plants». *ASTM Special Technical Publication*, no 1091, p. 297-307.
- Miller, M. A., r. M. Kudela, A. Mekebri, D. Crane, S. C. Oates, M. T. Tinker, M. Staedler, W. A. Miller, S. Toy-Choutka, C. Dominik, D. Hardin, G. Langlois, m. Murray, K. Ward et D. A. Jessup. 2010. «Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (Microcystin) transfer from land to sea otters». *Plos One*, vol. 5, no 9, p. 1-11.
- Mohamed, Z. A. 2008. «Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem». *Ecotoxicology*, vol. 17, no 6, p. 504-516.
- Mohapatra, P. K., R. Khillar, B. Hansdah et R. C. Mohanty. 2010. «Photosynthetic and fluorescence responses of *Solanum melangena* L. to field application of dimethoate». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 1, p. 78-83.
- Molina, P. E. 2004. *Endocrine Physiology*. Columbus, OH, USA: McGraw-Hill Companies, Inc. 298 p.
- Müller, P., X. P. Li et K. K. Niyogi. 2001. «Non-photochemical quenching. A response to excess light energy». *Plant Physiology*, vol. 125, no 4, p. 1558-1566.
- Murphy, T. P., K. Irvine, J. Guo, J. Davies, H. Murkin, M. Charlton et S. B. Watson. 2003. «New microcystin concerns in the lower Great Lakes». *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 38, no 1, p. 127-140.
- Nimrod, A. C., et W. H. Benson. 1996. «Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 26, no 3, p. 335-364.
- Nori, F., P. Carbone, F. Giordano, J. Osborn et I. Figà-Talamanca. 2006. «Endocrine-disrupting chemicals and testicular cancer: A case-control study». *Archives of Environmental and Occupational Health*, vol. 61, no 2, p. 87-95.
- Oberemm, A., J. Fastner et C. E. W. Steinberg. 1997. «Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*)». *Water Research*, vol. 31, no 11, p. 2918-2921.
- Oehlmann, J., U. Schulte-Oehlmann, M. Tillmann et B. Markert. 2000. «Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca: gastropoda) in the laboratory. Part I:

- Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens». *Ecotoxicology*, vol. 9, no 6, p. 383-397.
- Okada, K., M. Ikeuchi, N. Yamamoto, T. A. Ono et M. Miyao. 1996. «Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of Photosystem II by exposure to singlet oxygen: Factors responsible for the susceptibility to cleavage of the proteins». *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1274, no 1-2, p. 73-79.
- Okino, T., H. Matsuda, M. Murakami et K. Yamaguchi. 1995. «New microviridins, elastase inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 51, no 39, p. 10679-10686.
- Owens, T. G. 1996. «Processing of excitation energy by antenna pigments». In *Photosynthesis and the Environment*, N. R. Baker, p. 1-23. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Paixão, S. M., L. Silva, A. Fernandes, K. O'Rourke, E. Mendonca et A. Picado. 2008. «Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening». *Ecotoxicology*, vol. 17, no 3, p. 165-171.
- Palace, V. P., R. E. Evans, K. Wautier, C. L. Baron, J. Werner, J. F. Klaverkamp, K. A. Kidd et T. A. Dick. 2001. «Altered distribution of lipid-soluble antioxidant vitamins in juvenile sturgeon exposed to waterborne ethynylestradiol». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, no 10, p. 2370-2376.
- Pandard, P., J. Devillers, A. M. Charissou, V. Poulsen, M. J. Jourdain, J. F. Féraud, C. Grand et A. Bispo. 2006. «Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes». *Science of the Total Environment*, vol. 363, no 1-3, p. 114-125.
- Papageorgiou, J., T. A. Linke, C. Kapralos, B. C. Nicholson et D. A. Steffensen. 2004. «Extraction of cyanobacterial endotoxin». *Environmental Toxicology*, vol. 19, no 1, p. 82-87.
- Park, H. D., C. Iwami, M. F. Watanabe, K. I. Harada, T. Okino et H. Hayashi. 1998. «Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic microcystis species in a hypertrophie lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994)». *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 13, no 1, p. 61-72.
- Payne, J., N. Rajapakse, M. Wilkins et A. Kortenkamp. 2000. «Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens». *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, no 10, p. 983-987.
- Peck, M., R. W. Gibson, A. Kortenkamp et E. M. Hill. 2004. «Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, no 4, p. 945-952.

- Pedersen, K. H., S. N. Pedersen, K. L. Pedersen, B. Korsgaard et P. Bjerregaard. 2003. «Estrogenic effect of dietary 4-tert-octylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquatic Toxicology*, vol. 62, no 4, p. 295-303.
- Petrovic, M., et D. Barceló. 2006. «Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, no 3, p. 422-424.
- Petrovic, M., E. Eljarrat, M. J. Lopez De Alda et D. Barceló. 2004. «Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, no 3, p. 549-562.
- Petrovic, M., M. Solé, M. J. López de Alda et D. Barceló. 2002. «Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 21, no 10, p. 2146-2156.
- Pflugmacher, S. 2004. «Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR». *Aquatic Toxicology*, vol. 70, no 3, p. 169-178.
- Pflugmacher, S., V. Amé, C. Wiegand et C. Steinberg. 2001. «Cyanobacterial toxins and endotoxins-Their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms». *Wasser und Boden*, vol. 53, no 4, p. 15-20.
- Pflugmacher, S., K. Jung, L. Lundvall, S. Neumann et A. Peuthert. 2006. «Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, no 9, p. 2381-2387.
- Phillips, K. P., et N. Tanphaichitr. 2008. «Human exposure to endocrine disrupters and semen quality». *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, vol. 11, no 3-4, p. 188-220.
- Pietsch, C., C. Wiegand, M. V. Amé, A. Nicklisch, D. Wunderlin et S. Pflugmacher. 2001. «The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors». *Environmental Toxicology*, vol. 16, no 6, p. 535-542.
- Ploutno, A., M. Shoshan et S. Carmeli. 2002. «Three novel protease inhibitors from a natural bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Journal of Natural Products*, vol. 65, no 7, p. 973-978.

- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. «The application of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: Heavy metals, herbicides and air pollutants». In *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*, J. R. DeEll et P. M. A. Toivonen, p. 151-184. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Pouria, S., A. De Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. S. Barreto, C. J. Ward, W. Preiser, G. K. Poon, G. H. Neild et G. A. Codd. 1998. «Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil». *Lancet*, vol. 352, no 9121, p. 21-26.
- Poynton, H. C., et C. D. Vulpe. 2009. «Ecotoxicogenomics: Emerging technologies for emerging contaminants». *Journal of the American Water Resources Association*, vol. 45, no 1, p. 83-96.
- Puerto, M., S. Pichardo, A. Jos et A. M. Cameán. 2009. «Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells». *Toxicon*, vol. 54, no 2, p. 161-169.
- Ralph, P. J., R. A. Smith, C. M. O. MacInnis-Ng et C. R. Seery. 2007. «Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review». *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 89, no 4, p. 589-607.
- Rapala, J., K. Lahti, L. A. Räsänen, A. L. Esala, S. I. Niemelä et K. Sivonen. 2002. «Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment». *Water Research*, vol. 36, no 10, p. 2627-2635.
- Raven, P. H., R. F. Evert et S. E. Eichhorn. 2000. *Biologie végétale, traduction de la 6^e édition américaine*. Bruxelles: Éditions De Boeck Université, 968 p.
- Renner, R. 1997. «European bans on surfactant trigger transatlantic debate». *Environmental Science and Technology*, vol. 31, no 7, p. 316A-321A.
- Reshef, V., et S. Carmeli. 2001. «Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 57, no 14, p. 2885-2894.
- Reshef, V., et S. Carmeli. 2006. «New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Tetrahedron*, vol. 62, no 31, p. 7361-7369.
- Rey Vázquez, G., F. J. Meijide, R. H. Da Cuña, F. L. Lo Nostro, Y. G. Piazza, P. A. Babay, V. L. Trudeau, M. C. Maggese et G. A. Guerrero. 2009. «Exposure to waterborne 4-tert-octylphenol induces vitellogenin synthesis and disrupts testis morphology in the South American freshwater fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)». *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 150, no 2, p. 298-306.

- Richardson, S. D. 2009. «Water analysis: Emerging contaminants and current issues». *Analytical Chemistry*, vol. 81, no 12, p. 4645-4677.
- Rinehart, K. L., K. I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem et W. W. Carmichael. 1988. «Nodularin, microcystin, and the configuration of adda». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 110, no 25, p. 8557-8558.
- Riva, C., C. Porte, A. Binelli et A. Provini. 2010. «Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress». *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, vol. 152, no 2, p. 175-181.
- Roháček, K., et M. Barták. 1999. «Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications». *Photosynthetica*, vol. 37, no 3, p. 339-363.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, P. E. Hansen, W. Zhang, O. Czarnecki, M. Henning, J. Fastner, M. Erhard, B. A. Neilan et M. Kaebernick. 2003. «Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new Microcystis metabolite toxic to *Daphnia*». *Journal of Chemical Ecology*, vol. 29, no 8, p. 1757-1770.
- Rohrlack, T., K. Christoffersen, M. Kaebernick et B. A. Neilan. 2004. «Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no 8, p. 5047-5050.
- Rojicková-Padrťová, R., et B. Maršálek. 1999. «Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing». *Chemosphere*, vol. 38, no 14, p. 3329-3338.
- Rojicková-Padrťová, R., B. Maršálek et I. Holoubek. 1998. «Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery». *Chemosphere*, vol. 37, no 3, p. 495-507.
- Romanowska-Duda, Z., J. Mankiewicz, M. Tarczyska, Z. Walter et M. Zalewski. 2002. «The Effect of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) on Water Plants and Animal Cells». *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 11, no 5, p. 561-566.
- Romanowska-Duda, Z., et M. Tarczyska. 2002. «The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 5, p. 434-440.
- Rondeau, B. (2005). La qualité de l'eau du secteur fluvial - La contamination par les toxiques, 2^e édition. Région du Québec et ministère du Développement durable Environnement Canada, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Gouvernement du Québec. ENV/2005/270

- Runnegar, M. T. C., J. Andrews, R. G. Gerdes et I. R. Falconer. 1987. «Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Toxicon*, vol. 25, no 11, p. 1235-1239.
- Sabatini, S. E., A. B. Juárez, M. R. Eppis, L. Bianchi, C. M. Luquet et M. C. Ríos de Molina. 2009. «Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 72, no 4, p. 1200-1206.
- Sabik, H., F. Gagné, C. Blaise, D. J. Marcogliese et R. Jeannot. 2003. «Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*)». *Chemosphere*, vol. 51, no 5, p. 349-356.
- Safe Drinking Water Foundation. (2010). En ligne: <http://www.safewater.org/home.html>. Consulté le 11 septembre, 2010.
- Samson, G., O. Prášil et B. Yaakoubd. 1999. «Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence». *Photosynthetica*, vol. 37, no 2, p. 163-182.
- Saqrane, S., I. El ghazali, B. Oudra, L. Bouarab, S. Dekayir, L. Mandi, N. Ouazzani et V. M. Vasconcelos. 2009. «Detection of microcystin contamination by the measurement of the variability of the in vivo chlorophyll fluorescence in aquatic plant *Lemna gibba*». *Toxicon*, vol. 53, no 1, p. 9-14.
- Saqrane, S., I. E. Ghazali, Y. Ouahid, M. E. Hassni, I. E. Hadrami, L. Bouarab, F. F. del Campo, B. Oudra et V. Vasconcelos. 2007. «Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction». *Aquatic Toxicology*, vol. 83, no 4, p. 284-294.
- Schramm, K. W., W. Jaser, G. Welzl, G. Pfister, G. F. Wöhler-Moorhoff et B. A. Hense. 2008. «Impact of 17 α -ethinylestradiol on the plankton in freshwater microcosms-I: Response of zooplankton and abiotic variables». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 69, no 3, p. 437-452.
- Schrciber, U., P. Quayle, S. Schmidt, B. I. Escher et J. F. Mueller. 2007. «Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging». *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no 11, p. 2554-2563.
- Sedmak, B., et T. Elersek. 2006. «Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons». *Microbial Ecology*, vol. 51, no 4, p. 508-515.
- Segner, H., J. M. Navas, C. Schäfers et A. Wenzel. 2003. «Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 54, no 3, p. 315-322.

- Servos, M., D. Bennie, K. Burnison, P. Cureton, N. Davidson et T. Rawn. 2001. «Uncertainties associated with assessing the risk of an endocrine active substance in the Canadian environment». *Water Quality Research Journal of Canada*, vol. 36, no 2, p. 319-330.
- Servos, M. R., R. J. Maguire, D. T. Bennie, H. B. Lee, P. M. Cureton, N. Davidson, R. Sutcliffe et D. F. K. Rawn. 2003. «An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment». *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 9, no 2, p. 569-587.
- Severin, G. F., G. Welzl, I. Jüttner, G. Pfister et K. W. Schramm. 2003. «Effects of nonylphenol on zooplankton in aquatic microcosms». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, no 11, p. 2733-2738.
- Shao, B., J. Hu et M. Yang. 2003. «Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 70, no 3, p. 527-532.
- Sharma, V. K., G. A. K. Anquandah, R. A. Yngard, H. Kim, J. Fekete, K. Bouzek, A. K. Ray et D. Golovko. 2009. «Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment». *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, vol. 44, no 5, p. 423-442.
- Shen, H., P. Xu, W. Yu, Y. Liu et D. Wu. 2003. «Effects of p-nonylphenol on Expression of ER Protein and ER α mRNA of MCF-7 Cells». *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, vol. 34, no 4, p. 641-644.
- Sigma-Aldrich Co. (2010). En ligne:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=E8875|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. Consulté le 3 septembre, 2010.
- Sivonen, J, et G Jones. 1999. «Cyanobacterial toxins». In *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management*, I Chorus et J Bartram, p. 41-111. London: E & FN Spon.
- Skulberg, O. M., W. W. Carmichael, G. A. Codd et R. Skulberg. 1993. «Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria)». In *Algal toxins in seafood and drinking water*, I. R. Falconer, p. 145-164. London: Academic Press.
- Soares, A., B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell et J. N. Lester. 2008. «Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters». *Environment International*, vol. 34, no 7, p. 1033-1049.

- Sonnenschein, C., et A. M. Soto. 1998. «An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists». *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 65, no 1-6, p. 143-150.
- Spoof, L., P. Vesterkvist, T. Lindholm et J. Meriluoto. 2003. «Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography- electrospray ionisation mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, vol. 1020, no 1, p. 105-119.
- Staples, C., E. Mihaich, J. Carbone, K. Woodburn et G. Klecka. 2004. «A weight of evidence analysis of the chronic ecotoxicity of nonylphenol ethoxylates, nonylphenol ether carboxylates, and nonylphenol». *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 10, no 6, p. 999-1017.
- Stavarakakis, C., R. Colin, V. Hequet, C. Faur et P. Le Cloirec. 2008. «Analysis of endocrine disrupting compounds in wastewater and drinking water treatment plants at the nanogram per litre level». *Environmental Technology*, vol. 29, no 3, p. 279-286.
- Stein, J. 1972. *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press, 448 p.
- Stewart, I., P. J. Schluter et G. R. Shaw. 2006. «Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - A review». *Environmental Health: A Global Access Science Source*, vol. 5, no 7.
- Stewart, I., A. A. Seawright et G. R. Shaw. 2008. «Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds--an overview». *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 619, p. 613-637.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. «Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria». *Photochemistry and Photobiology*, vol. 61, no 1, p. 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. «The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples». In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, p. 445-483. London: Taylor & Francis.
- Strasser, R. J., et A. D. Stirbet. 2001. «Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O-J-I-P - Fitting of experimental data to three different PS II models». *Mathematics and Computers in Simulation*, vol. 56, no 4-5, p. 451-461.
- Strasser, R. J., et B.J. Strasser. 1995. «Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test». In *Photosynthesis from Light to Biosphere*, P. Mathis, p. 977-980. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Strenn, B., M. Clara et N. Kreuzinger. 2003. «Degradation and adsorption to activated sludge of Bisphenol-A, 17- β -Estradiol and 17- α -ethinylestradiol». *Progress in Water Resources*, vol. 8, p. 237-246.
- Sukenik, A., R. Eshkol, A. Livne, O. Hadas, M. Rom, D. Tchernov, A. Vardi et A. Kaplan. 2002. «Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): A novel allelopathic mechanism». *Limnology and Oceanography*, vol. 47, no 6, p. 1656-1663.
- Svrcek, C., et D. W. Smith. 2004. «Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review». *Journal of Environmental Engineering and Science*, vol. 3, no 3, p. 155-185.
- Tabata, A., S. Kashiwada, Y. Ohnishi, H. Ishikawa, N. Miyamoto, M. Itoh et Y. Magara. 2001. «Estrogenic influences of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations». *Water Science and Technology*, vol. 43, no 2, p. 109-116.
- Taiz, L., et E. Zeiger. 2006. *Plant physiology*, 4^e. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 968 p.
- Takahashi, A., T. Higashitani, Y. Yakou, M. Saitou, H. Tamamoto et H. Tanaka. 2003. «Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disruptors into periphytons and benthos in the Tama River». *Water Science and Technology*, vol. 47, no 9, p. 71-76.
- Takamatsu, M., M. Goto et Y. Abe. 2009. «Bioconcentration of 4-n-nonylphenol in the common carp (*Cyprinus carpio*)». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 18, no 8, p. 1503-1506.
- Ternes, T. A., P. Kreckel et J. Mueller. 1999. «Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic batch experiments with activated sludge». *Science of the Total Environment*, vol. 225, no 1-2, p. 91-99.
- Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R. D. Wilken et M. Servos. 1999. «Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil». *Science of the Total Environment*, vol. 225, no 1-2, p. 81-90.
- Toivola, D. M., R. D. Goldman, D. R. Garrod et J. E. Eriksson. 1997. «Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments». *Journal of Cell Science*, vol. 110, no 1, p. 23-33.
- Toomey, B. H., G. H. Monteverdi et R. T. Di Giulio. 1999. «Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 18, no 4, p. 734-739.

- Törökné, A., R. Vasdinnyi et B. M. Asztalos. 2007. «A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins». *Environmental Toxicology*, vol. 22, no 1, p. 64-68.
- Trebst, A. 2007. «Inhibitors in the functional dissection of the photosynthetic electron transport system». *Photosynthesis Research*, vol. 92, no 2, p. 217-224.
- Trudeau, V. L., S. Chiu, S. W. Kennedy et R. J. Brooks. 2002. «Octylphenol (OP) alters the expression of members of the amyloid protein family in the hypothalamus of the snapping turtle, *Chelydra serpentina serpentina*». *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no 3, p. 269-275.
- Valdor, R., et M. Aboal. 2007. «Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria». *Toxicon*, vol. 49, no 6, p. 769-779.
- Van Apeldoorn, M. E., H. P. Van Egmond, G. J. A. Speijers et G. J. I. Bakker. 2007. «Toxins of cyanobacteria». *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 51, no 1, p. 7-60.
- Van Den Belt, K., P. Berckmans, C. Vangenechten, R. Verheyen et H. Witters. 2004. «Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol». *Aquatic Toxicology*, vol. 66, no 2, p. 183-195.
- van der Grinten, E., M. G. Pikkemaat, E. J. van den Brandhof, G. J. Stroomborg et M. H. S. Kraak. 2010. «Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics». *Chemosphere*, vol. 80, no 1, p. 1-6.
- Van Miller, J. P., et C. A. Staples. 2005. «Review of the potential environmental and human health-related hazards and risks from long-term exposure to p-tert-octylphenol». *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 11, no 2, p. 319-351.
- Vardi, A., D. Schatz, K. Beerli, U. Motro, A. Sukenik, A. Levine et A. Kaplan. 2002. «Dinoflagellate-cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake». *Current Biology*, vol. 12, no 20, p. 1767-1772.
- Vazquez-Duhalt, R., F. Marquez-Rocha, E. Ponce, A. F. Licea et M. T. Viana. 2006. «Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review». *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 4, no 1, p. 1-25.
- Viglino, L., K. Aboulfadl, A. D. Mahvelat, M. Prévost et S. Sauvé. 2008a. «On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters». *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 10, no 4, p. 482-489.

- Viglino, L., K. Aboulfadl, M. Prévost et S. Sauvé. 2008b. «Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS». *Talanta*, vol. 76, no 5, p. 1088-1096.
- Virtanen, H. E., E. Rajpert-De Meyts, K. M. Main, N. E. Skakkebaek et J. Toppari. 2005. «Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 207, no 2 SUPPL, p. S501-S505.
- Visser, P. M., B. W. Ibelings, L. R. Mur et A. E. Walsby. 2005. «The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*; features explaining its success and measures for its control». In *Harmful cyanobacteria*, J. Huisman, H.C.P. Matthijs et P. M. Visser, p. 109-142. New York: Springer.
- Vredenberg, W. J. 2000. «A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination». *Biophysical Journal*, vol. 79, no 1, p. 26-38.
- Wang, J., et P. Xie. 2007. «Antioxidant enzyme activities of *Microcystis aeruginosa* in response to nonylphenols and degradation of nonylphenols by *M. aeruginosa*». *Environmental geochemistry and health*, vol. 29, no 5, p. 375-383.
- Wang, J., P. Xie et N. Guo. 2007. «Effects of nonylphenol on the growth and microcystin production of *Microcystis* strains». *Environmental Research*, vol. 103, no 1, p. 70-78.
- Wang, X., X. Han, Y. Hou, G. Yao et Y. Wang. 2003. «Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells in vitro». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 70, no 5, p. 898-904.
- Ward, C. J., et G. A. Codd. 1999. «Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*». *Journal of Applied Microbiology*, vol. 86, no 5, p. 874-882.
- Weiner, J. A., M. E. DeLorenzo et M. H. Fulton. 2004. «Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species». *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no 2, p. 121-128.
- Welker, M., S. Khan, M. M. Haque, S. Islam, N. H. Khan, I. Chorus et J. Fastner. 2005. «Microcystins (cyanobacterial toxins) in surface waters of rural Bangladesh: pilot study». *Journal of water and health*, vol. 3, no 4, p. 325-337.
- Welker, M., B. Maršálek, L. Šejnohová et H. von Döhren. 2006. «Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity». *Peptides*, vol. 27, no 9, p. 2090-2103.

- Westrick, J. A. 2008. «Cyanobacterial toxin removal in drinking water treatment processes and recreational waters». In *Cyanobacterial harmful algal blooms. State of the science and reseach needs, Advances in experimental medicine and biology.*, H. Kenneth Hudnell, p. 949. New York, NY, USA: Springer Science and Business Media.
- Westrick, J. A., D. C. Szlag, B. J. Southwell et J. Sinclair. 2010. «A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no 5, p. 1705-1714.
- White, A. J., et C. Critchley. 1999. «Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus». *Photosynthesis Research*, vol. 59, no 1, p. 63-72.
- Wiegand, C., A. Peuthert, S. Pflugmacher et S. Carmeli. 2002. «Effects of microcin SF608 and microcystin-LR two cyanotobacterial compounds produced by *Microcystis* sp., on aquatic organisms». *Environmental Toxicology*, vol. 17, no 4, p. 400-406.
- Wiegand, C., et S. Pflugmacher. 2005. «Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review». *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 203, no 3 SPEC. ISS., p. 201-218.
- Wilson, A. E., W. A. Wilson et M. E. Hay. 2006. «Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*». *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no 11, p. 7386-7389.
- Wu, Z., Z. Zhang, S. Chen, F. He, G. Fu et W. Liang. 2007. «Nonylphenol and octylphenol in urban eutrophic lakes of the subtropical China». *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 16, no 3, p. 227-234.
- Yamaki, H., N. Sitachitta, T. Sano et K. Kaya. 2005. «Two new chymotrypsin inhibitors isolated from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-88». *Journal of Natural Products*, vol. 68, no 1, p. 14-18.
- Yin, L., J. Huang, W. Huang, D. Li et Y. Liu. 2005a. «Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR». *Toxicon*, vol. 46, no 8, p. 859-864.
- Yin, L., J. Huang, W. Huang, D. Li, G. Wang et Y. Liu. 2005b. «Microcystin-RR-induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in tobacco BY-2 cells». *Toxicon*, vol. 46, no 5, p. 507-512.
- Ying, G. G., B. Williams et R. Kookana. 2002. «Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - A review». *Environment International*, vol. 28, no 3, p. 215-226.

- Yoshizawa, S., R. Matsushima, M. F. Watanabe, K. Harada, A. Ichihara, W. W. Carmichael et H. Fujiki. 1990. «Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 116, no 6, p. 609-614.
- Yu, J., X. X. Tang, P. Y. Zhang et S. L. Dong. 2005. «Effects of CO₂ enrichment on growth, photosynthesis and activities of antioxidant enzymes of two marine micro-green-algae». *Acta Ecologica Sinica*, vol. 25, no 2, p. 197-202.
- Zhang, T., H. Gong, X. Wen et C. Lu. 2010. «Salt stress induces a decrease in excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem II but an increase to photosystem I in the cyanobacterium *Spirulina platensis*». *Journal of Plant Physiology*, vol. 167, no 12, p. 951-958.